

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1936

THÈSE

336

N° 4

POUR

LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(MENTION MÉDECINE)

PRÉSENTÉE PAR

VITALY CHORINE

Né le 8 février 1906, en Russie.

à Moscou

LES

RÉACTIONS SÉROLOGIQUES
DUES AUX EUGLOBULINES

Président : M. BINET, Professeur

PARIS

A. MARETHEUX ET L. PACTAT, IMPRIMEURS

1, RUE CASSETTE, 1

1936

188

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1936

THÈSE

N° 4

POUR

LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(MENTION MÉDECINE)

PRÉSENTÉE PAR

VITALY CHORINE

Né le 8 février 1906, en Russie.

LES

RÉACTIONS SÉROLOGIQUES DUES AUX EUGLOBULINES

Président : M. BINET, Professeur

PARIS

A. MARETHEUX ET L. PACTAT, IMPRIMEURS

1, RUE CASSETTE, 1

1936

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Le Doyen. **M. ROUSSY.**

I. — Professeurs.

	MM.
Anatomie	ROUVIÈRE.
Physiologie	LÉON BINET.
Physique médicalé.	STROHL.
Chimie médicale	DESGREZ.
Bactériologie.	ROBERT DEBRÉ.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie médicale et générale	BAUDOUIN.
Pathologie chirurgicale.	CHEVASSU.
Anatomie pathologique.	ROUSSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	HARVIER.
Hygiène et médecine préventive.	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LAIGNEL-LAVASTINE.
Pathologie expérimentale et comparée.	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	MAURICE VILLARET.
Clinique médicale	LOEPER.
	CARNOT.
	CLERC.
	MARCEL LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBOULLET.
Clinique des maladies des enfants	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux.	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
	CUNÉO.
Clinique chirurgicale	GOSSET.
	GREGOIRE.
	LENORMANT.
Clinique ophtalmologique.	TERRIEN.
Clinique urologique	MARION.
	BRINDEAU.
Clinique d'accouchements.	COUVELAIRE.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique.	MOCQUOT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	OMBRÉANNE.
Clinique thérapeutique médicale	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique.	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	PIERRE DUVAL.
Clinique propédeutique.	SERGENT.
Clinique de la tuberculose	BEZANÇON.
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte	MATHIEU.
	HOVELACQUE.
Professeurs sans chaire.	MULON.
	OLIVIER.
	VERNE.



II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. BÉNARD (HENRI).	Pathologie médicale.
BERNARD (ETIENNE).	Pathologie médicale.
BESANÇON (JUSTIN).	Hydrologie.
BOULIN.	Pathologie médicale.
BULLIARD.	Histologie.
CATHALA.	Pathologie médicale.
CHEVALLIER.	Pathologie médicale.
DOGNON.	Physique.
FEY.	Urologie.
GALLIARD.	Parasitologie.
GASTINEL.	Bactériologie.
DE GAUDART D'ALLAINES.	Pathologie chirurgicale.
GAYET.	Physiologie.
GIROUD.	Histologie.
HAGUENAU.	Pathologie médicale.
HALPHEN.	Oto-rhino-laryngologie.
HAZARD.	Pharmacologie.
HUGUENIN.	Anatomie pathologique.
JOANNON.	Hygiène.
LABBÉ (HENRI).	Chimie biologique.
LACOMME.	Obstétrique.
LANTUÉJOUL.	Obstétrique.
LAROCHE (GUY).	Pathologie médicale.
LEMAIRE.	Pathologie expérimentale.
LEVEUF.	Pathologie chirurgicale.
M ^{lle} J. LÉVY.	Pharmacologie.
LÉVY-VALENSI.	Neurologie et Psychiatrie.
MOREAU.	Pathologie médicale.
MOULONGUET.	Pathologie chirurgicale.
MOUQUIN.	Pathologie médicale.
OBERLING.	Anatomie pathologique.
PETIT-DUTAILLIS.	Pathologie chirurgicale.
PIÉDELIEVRE.	Médecine légale.
PORTES.	Obstétrique.
RICHET.	Physiologie.
SANNIE.	Chimie biologique.
SÉNÈQUE.	Pathologie chirurgicale.
TROISIER.	Pathologie expérimentale.
TURPIN.	Pathologie médicale.
VIGNES.	Obstétrique.
WILMOTH.	Pathologie chirurgicale.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM. ALGLAVE.	Pathologie chirurgicale.
BUSQUET.	Pharmacologie.
CHAILLEY-BERT.	Physiologie.
LEROUX.	Anatomie pathologique.
NEVEU-LEMAIRE.	Parasitologie.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE
A TITRE PERMANENT

Clinique médicale.

MM. ABRAMI. ALAJOUANINE. AUBERTIN. BRULÉ CHABROL. CHIRAY.	MM. DONZELOT. DUVOIR. LIAN. PASTEUR VALLERY-RADOT. SÉZARY.
--	--

Clinique chirurgicale.

MM. BASSET. BROCO. CADENAT. GATELLIER. HEITZ-BOYER.	MM. MOURE. QUENU. SCHWARTZ. VELTER.
---	--

Clinique obstétricale.

MM. ECALLE. GUÉNIOT. LE LORIER.	MM. LÉVY-SOLAL. METZGER.
---------------------------------------	-----------------------------

V. — CHARGÉS DE COURS

MM. CHAILLEY-BERT, agrégé.	Education physique.
LEDoux-LEBARD	Radiologie clinique.
WEIL-HALLÉ	Puériculture.
RUPPE	Stomatologie.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

A MON CHER MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR MARCHOUX

En témoignage de ma respectueuse vénération et de l'affectueuse reconnaissance que je lui dois pour l'aide constante qu'il n'a cessé de me prodiguer tant dans la science que dans la vie.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MA MÈRE

LES RÉACTIONS SÉROLOGIQUES DUES AUX EUGLOBULINES

CHAPITRE PREMIER

LA RÉACTION DE HENRY

La réaction proposée par Henry [50], en 1927, pour le diagnostic du paludisme est à l'heure présente bien connue et partout acceptée. Elle est basée sur la propriété que possède le sérum paludéen de flocculer en présence de mélanine en milieu de faible concentration moléculaire. La mélanine s'extrait de la choroïde des yeux de bœuf dilacérée dans l'eau distillée et additionnée de formol du commerce à raison de 1 p. 200. Une fois débarrassée par centrifugation de tous débris de tissus, l'opacité de la suspension est ramenée à un titre tel que, diluée à 1 p. 10 dans l'eau distillée, elle marque 48°-49° au photomètre de V. B. Y. Enfin, pour l'usage, on titre sur sérum paludéen la suspension de mélanine par rapport à un échantillon connu.

On dilue la mélanine au dixième dans deux tubes contenant l'un de l'eau distillée, l'autre de l'eau salée à 3 p. 1.000. A 1 cent. cube de chaque dilution de mélanine, on ajoute 0 c. c. 2 du sérum à examiner. On utilise en même temps deux tubes témoins contenant l'un de l'eau distillée, l'autre de l'eau salée

formolée au même titre. Henry alcalinise l'eau distillée et l'eau salée qu'il emploie par la soude $\frac{N}{400}$ à raison de 0 c. c. 25 p. 100 cent. cubes. Cette alcalinisation est tout illusoire, car le CO_2 de l'air neutralise une telle proportion de soude en quelques heures.

Les réactions positives se manifestent par une floculation plus ou moins abondante de la mélanine. Souvent le tube témoin à l'eau distillée flocule aussi, mais ordinairement moins que le sérum additionné de mélanine. Dans ce cas, on ne lit que les tubes préparés avec l'eau salée dont le témoin, sauf dans quelques cas très rares, reste clair.

NATURE DE LA RÉACTION.

THÉORIE DE HENRY [50]. — Quand Henry imagina sa réaction, il partit de cette idée que le pigment mélanique que l'on trouve dans l'organisme des paludéens joue le rôle d'antigène et amène la formation d'anticorps qui précipiteraient la mélanine. Le Bourdellès a beaucoup contribué à développer cette théorie.

I. — Les anticorps ne sont pas en jeu dans la réaction.

Quand nous avons commencé nos études sur la réaction, nous avons accepté l'idée de Henry sur la nature spécifique de la réaction, mais nous avons dû très vite l'abandonner.

1° La mélanine ne possède de propriété antigène que chez les albinos. En collaboration avec Gillier [25] nous avons inoculé des lapins de pelage coloré {avec une suspension de mélanine provenant des yeux de bœuf ou du sarcome mélanique du cheval, celle-ci convenant d'ailleurs aussi bien que l'autre pour la réaction de Henry. Après une dizaine d'injections intraveineuses chez des lapins, péritonéales chez des lapins et des cobayes, la réaction se montra constamment négative. Greig, van Rooyen et Hendry [49]} ont confirmé nos expériences à cet égard.

La mélanine ne possède donc pas de propriété antigène. Kritchevsky et Rubinstein [55] ont voulu lui attribuer un rôle

d'aptène dont ils auraient vérifié la réalité après préparation de lapins et d'oiseaux (linottes et serins) avec un mélange de sérum de porc et de mélanine. Nous avons vainement répété les expériences de Kritchevsky et Rubinstein sans réussir à les confirmer.

Adant [2] a obtenu une sensibilisatrice spécifique en se servant de lapins albinos, observation indiquant que la mélanine devient antigène quand elle manque chez les animaux d'expérience.

D'ailleurs le pigment paludéen diffère absolument de la mélanine. Il provient de l'attaque par le parasite de la molécule d'hémoglobine, tandis que la mélanine dérive de substances protéiques, même non chromogènes. Il ne peut donc exister aucun rapport immunologique entre ces deux substances.

Trensz [98], même avec l'hémozoïne extraite de la rate et du foie de paludéens morts d'accès pernicieux, n'a pas pu provoquer l'apparition d'anticorps.

S'il fallait d'autres faits pour confirmer la non-spécificité de la réaction, nous n'aurions pas de peine à en fournir.

2° En collaboration avec M^{lle} Koechlin [29] nous avons constaté que la réaction de Henry varie de jour en jour pour un même sérum séparé du caillot, en décrivant une courbe sinusoïdale, tandis que le maintien du sérum sur le caillot stabilise relativement les propriétés de celui-ci dont l'activité floculante s'atténue lentement et progressivement. La lecture des chiffres d'opacité au photomètre V. B. Y. pour un sérum normal suit d'ailleurs une courbe identique, mais d'amplitude moindre.

3° Les anticorps exigent un certain temps pour se former. Or, nous avons constaté [24] que la réaction à la mélanine apparaît chez les paralytiques généraux trois à sept jours après l'impaludation par injection de sang palustre, souvent même avant le premier accès. Des constatations analogues ont été faites par Alcaÿ, Cottoir et Marill, en Algérie [4].

4° Il convient encore de faire ressortir l'inhibition de la réaction par les sels neutres à une concentration bien inférieure à celle qui inhibe l'action des anticorps. La réaction de Henry ne se produit que dans l'eau distillée ou les solutions salines faibles; elle est entravée dès que la concentration moléculaire dépasse 3 à 4 grammes de NaCl par litre.

Nous pourrions ajouter à ces arguments d'autres encore qui nous sont fournis par des expériences que nous exposerons plus loin et dont les résultats ne sont pas d'accord avec la spécificité de la réaction de Henry. Ici, nous n'en avons relaté que quelques-uns qui nous paraissent suffire à démontrer que les anticorps spécifiques ne sont pas en jeu dans la réaction de Henry.

II. — Réaction de Henry et floculation dans l'eau distillée.

Henry a remarqué que les sérums de paludéens sont souvent instables dans l'eau distillée et y flocculent parfois en dilution à 1 p. 5. Comme la mélanofloculation est faite dans des solutions hypotoniques, il utilise pour la réaction des solutions salines de 0 à 3 p. 1.000 de NaCl qui n'ont pas le même inconvénient. Le parallélisme de ces deux floculations a frappé plusieurs observateurs et Trensztz suppose qu'il existe entre elles un lien de parenté [92]. Nous avons étudié de plus près le rapport qui existe entre ces deux phénomènes.

Pour ces expériences, nous avons pris un sérum de paludéen très positif à la mélanine et nous avons pratiqué une série de réactions dans des solutions de plus en plus concentrées en NaCl. La première réaction a été faite en eau distillée et les autres dans l'eau salée, la deuxième à 1 p. 1.000, la troisième à 2 p. 1.000, la quatrième à 3 p. 1.000, etc., jusqu'à 10 p. 1.000. Le graphique suivant exprime les résultats obtenus. L'expérience répétée avec de nombreux sérums s'est comportée de même.

La floculation à la mélanine est toujours plus marquée que la floculation dans l'eau distillée. La raison en est que la mélanine, dont la masse s'associe à la floculation préexistante, la rend plus apparente. Quand la dilution du sérum dans l'eau distillée devient très opaque, l'addition de sels neutres est nécessaire pour diminuer l'intensité de la floculation. Si nous désignons la floculation à la mélanine par la lettre A et la floculation dans l'eau distillée par la lettre B, nous constatons que l'écartement de ces deux lignes va en diminuant, mais jusqu'à un certain point seulement. La floculation dans l'eau distillée

décroît d'intensité progressivement avec l'augmentation de la concentration moléculaire et les flocons deviennent de plus en plus petits. Chacun d'eux retenant de moins en moins de mélanine, les deux réactions se rapprochent lentement comme intensité et les courbes deviennent parallèles. Ce parallélisme commence sur notre graphique en D, mais il est évident que

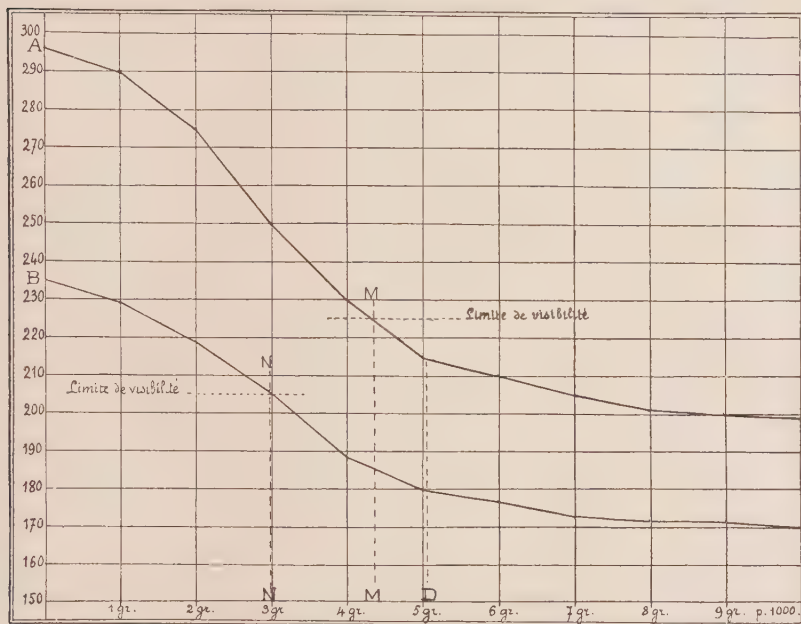


FIG. 1. — La courbe supérieure A représente la flocculation du sérum dans l'eau salée additionnée de mélanine ; la courbe inférieure B, la flocculation dans le même solvant sans mélanine. En ordonnées, nous avons porté le degré photométrique ; en abscisses, la concentration de la solution en NaCl. Sur les deux courbes nous avons marqué deux points M et N, limite inférieure de la flocculation appréciable macroscopiquement. Nos deux courbes ne peuvent être correctement établies que si la flocculation dans l'eau distillée n'est pas très forte parce qu'alors l'opacité est telle que l'œil n'est plus à même d'apprécier une différence entre les deux réactions.

si l'écart au départ est moindre, la limite D se rapproche de la ligne des ordonnées. L'écart permanent des lignes A et B tient à l'opacité propre de la mélanine.

Pour avoir des résultats nets, il faut s'adresser à un sérum qui ne floccule pas avec trop d'intensité, car lorsque les chiffres

d'opacité du mélange relevés au photomètre dépassent 300 avec écrans Wratten α 70 et O-A, le précipité formé adhère partiellement au verre; d'autre part, la taille des grains s'oppose à une suspension homogène et les chiffres de la lecture varient grandement avec les moyens employés pour mélanger le contenu du tube.

La réaction à la mélanine est encore visible entre les deux parallèles N et M, alors que la floculation dans l'eau salée sans mélanine n'est déjà plus appréciable macroscopiquement. Mais, comme l'indique le graphique, en décroissant, elles restent encore aisément perceptibles au photomètre V. B. Y. L'écartement des deux courbes reste à peu près constant; par conséquent, les deux floculations sont pareillement influencées par la concentration moléculaire et non pas l'une seule d'entre elles comme porterait à le croire la réaction macroscopique.

Henry considère la floculation dans l'eau distillée comme un phénomène tout différent de la mélanofloculation; c'est pour cela qu'il a cherché à neutraliser l'action de l'eau distillée en y ajoutant des sels neutres. Dans notre graphique, la floculation à la mélanine devient invisible au delà de M, et la réaction dans ce cas est négative. La floculation dans l'eau distillée visible macroscopiquement en deçà de N doit, d'après Henry, être considérée comme non spécifique. Dans la zone de concentration variant de N à M, la mélanine flocule apparemment seule, et, sans le secours d'un appareil optique tel que le photomètre de V. B. Y., on serait porté à croire que la floculation dans l'eau distillée est seule entravée par l'élévation de la concentration et que les deux réactions sont indépendantes l'une de l'autre, mais il n'en est rien. Il est évident que la floculation de la mélanine n'est pas plus spécifique entre M et N qu'en deçà de N. En réalité, si au lieu de s'en tenir au seul secours de l'œil, on emploie un appareil plus délicat comme le photomètre V. B. Y., on s'aperçoit que la réaction à la mélanine est encore manifeste après le point M, de même que la floculation dans l'eau distillée persiste au delà de N. Au total, comme l'indique le parallélisme des courbes, la mélanofloculation n'est pas autre chose qu'une floculation dans l'eau distillée, rendue plus apparente par addition de mélanine. En mesurant l'une, on connaît le comportement du sérum vis-à-vis de l'autre.

FLOCCULATION DANS L'EAU DISTILLÉE. — L'intensité varie d'un sérum à l'autre. Il arrive souvent qu'un sérum de paludéen floccule apparemment très peu dans l'eau distillée quand on le dilue à 1 p. 5 comme dans la réaction de Henry. Dans ce cas, la flocculation à la mélanine est seule macroscopiquement perceptible; mais en dilution à 1 p. 10 tous les sérums paludéens flocculent dans l'eau distillée comme nous l'avons constaté en collaboration, soit avec Prudhomme, soit avec M^{lle} Kœchlin [26, 27].

Le mélange plus riche en sérum donne des résultats inconstants et les mélanges moins riches des flocculations moins spécifiques.

L'intensité de la flocculation a été mesurée au photomètre V. B. Y., d'après la technique suivante : une première lecture faite aussitôt après le mélange de sérum et d'eau distillée donne la valeur de l'opacité de ce mélange. Au bout de trois heures de séjour à l'étuve à 37°, et ensuite de vingt minutes à la température du laboratoire, on procède à une seconde lecture. Celle-ci indique la nouvelle valeur de l'opacité. La différence entre les deux chiffres observés donne l'intensité de la flocculation. Il est à remarquer que le chiffre de la première lecture est à peu près le même pour tous les sérums que nous avons essayés et est compris entre 145 et 165.

Nous avons représenté les résultats dans le graphique ci-dessus

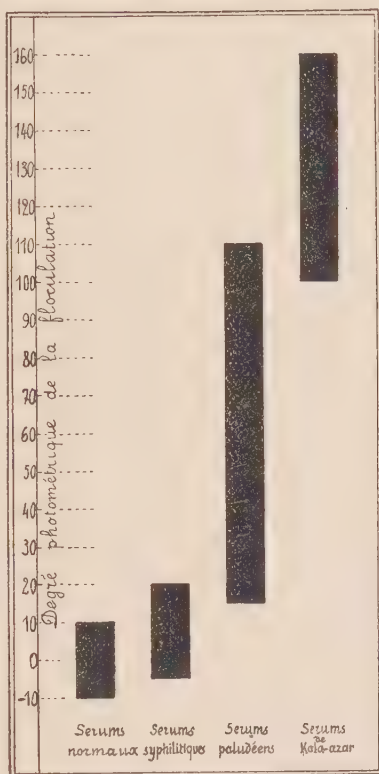


FIG. 2. — L'intensité de la flocculation dans l'eau distillée des divers sérums normaux et pathologiques. Le graphique a été établi sans prendre en considération les quelques rares sérums exceptionnels.

qui a été construit d'après les données fournies par l'examen de 354 sérums : 158 sérums normaux, 130 sérums syphilitiques et 66 sérums paludéens.

Les sérums normaux floclent faiblement ; pour 151 sérums, l'intensité de la réaction était au-dessous de 10, pour 6 autres, entre 10 et 15, et pour un seulement elle était de 21.

Les sérums syphilitiques floclent déjà sensiblement plus. Si 105 de 130 sérums ont présenté une flocculation au-dessous de 10, 12 sérums floclaient entre 10 et 15, et 13 à plus de 15.

Les sérums paludéens prélevés en dehors de l'accès ont tous présenté une flocculation au-dessus de 10. 60 sérums sur 66 ont donné une flocculation comprise entre 20 et 115, 3 entre 15 et 20 et les 3 derniers entre 10 et 15.

Il est superflu d'ajouter que la réaction de Henry à la mélanine fournit des indications tout à fait comparables dès que la flocculation dans l'eau distillée dépasse 15-20.

En résumé, les sérums normaux, syphilitiques et paludéens mélangés au dixième avec l'eau distillée se distinguent nettement les uns des autres par l'intensité de la flocculation.

Les sérums normaux ne floclent pas ou floclent peu.

Les sérums syphilitiques floclent légèrement dans l'eau distillée et Klausner a proposé d'utiliser cette propriété pour le diagnostic de la syphilis. En collaboration avec Prudhomme, nous avons constaté que, si la plupart des sérums syphilitiques floclent légèrement lorsqu'ils sont dilués au dixième dans l'eau distillée, ils ne floclent pas tous. La zone de flocculation, dans l'échelle d'intensité, est nettement au-dessous de celle des sérums paludéens et empiète, mais rarement, sur celle-ci. Dans ce dernier cas, il s'agit de sérums syphilitiques positifs à la mélanoflocculation. Elle empiète aussi, d'autre part, sur la zone de flocculation des sérums normaux.

Les sérums paludéens floclent avec intensité. Les sérums de Kala-azar se troublent presque instantanément et donnent par cette méthode des chiffres très élevés, souvent même l'opacité trop forte du flocculat interdit dès le début toute lecture. Si la première lecture permet de noter un chiffre, il peut arriver que celui de la deuxième lecture soit inférieur : c'est que le flocculat adhérant au verre du tube ne figure plus dans la cellule du photomètre. Pour éviter cet inconvénient, il convient d'agiter

de temps en temps les tubes pendant leur séjour à l'étuve.

Nous tenons à souligner que la mélanofloculation suit fidèlement la floculation dans l'eau distillée et qu'il est impossible de trouver un sérum positif à la mélanine qui ne soit en même temps instable dans l'eau distillée.

L'expérience suivante, faite par Prudhomme [84] sur notre conseil, est à cet égard très démonstrative. D'un sérum palustre très instable dans l'eau distillée et y floculant à la dilution de 1 p. 5, on sépare le floculat par centrifugation. Le liquide surnageant, limpide, additionné de mélanine, ne manifeste plus aucune tendance à la floculation. Les substances actives ont été précipitées par l'eau distillée. Si l'on reprend le précipité par une quantité d'eau physiologique égale à la quantité de sérum employé, on obtient un liquide de même valeur réactionnelle que le sérum primitif et qui, aux mêmes doses que lui, donnera lieu à une floculation très intense soit à l'eau distillée, soit à la mélanine.

Cette dilution du précipité en eau physiologique se comporte exactement comme le sérum d'où il provient, car si, comme le fait Henry, nous en mettons 0 c. c. 2 pour 1 cent. cube d'une solution saline à 2-4 p. 1.000, la mélanine flocule, alors que le tube témoin sans mélanine reste clair.

D'autres sérums paludéens sont plus stables et ne floculent pas en dilution à 1 p. 5 dans l'eau distillée, mais floculent toujours en présence de mélanine ; dilués au dixième, ils se troublent plus ou moins et, comme dans l'expérience précédente, on peut récupérer un précipité actif.

Les sérums normaux ne floculent pas dans l'eau distillée additionnée ou non de mélanine. Mais, comme ci-dessus, il est possible d'obtenir un précipité actif en les diluant à 1 p. 40, à 1 p. 50, et même parfois plus.

En définitive, il n'existe qu'une distinction quantitative entre les sérums paludéens très instables et les sérums normaux. Les premiers précipitent à une dilution beaucoup plus faible que les autres. Il en résulte qu'on peut prévoir la réponse à la mélanine en mesurant exactement la floculation du sérum dans l'eau distillée.

RÔLE DE LA MÉLANINE DANS LA RÉACTION.

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que le principe actif de la réaction n'est pas la mélanine, mais l'eau distillée. C'est l'eau distillée qui provoque la floculation du sérum dans la réaction de Henry. Les grains de mélanine s'attachent aux flocons de sérum et rendent la précipitation plus apparente. Le seul mérite que la mélanine possède est de permettre la lecture de la réaction à l'œil nu quand, pour certains sérums, la floculation dans l'eau distillée est faible. Elle joue donc le rôle d'indicateur, mais cette opinion n'est pas généralement acceptée et il faut la discuter.

Que la mélanine seule soit incapable de produire un changement quelconque dans le sérum des paludéens, on le voit par le fait que ce sérum pur ou dilué dans des solutions isotoniques de sels neutres et additionné de mélanine reste sans changement. Mais il suffit de produire une précipitation même discrète de certaines fractions protéiques du sérum pour que la mélanine commence à exercer son action en rendant la floculation plus apparente. Dans la réaction de Henry, cette précipitation du sérum est provoquée, comme nous l'avons vu, par l'eau distillée.

Mais elle peut être produite par n'importe quel agent physique ou chimique qui entraîne la précipitation des mêmes fractions de protéines sériques, que ce soit en milieu isotonique ou même hypertonique. En effet, une dilution du sérum à 2 p. 10 dans l'eau physiologique à 8,5 p. 1.000, ajustée à pH 5,4 reste claire; mais si on y ajoute de la mélanine ou certains autres colloïdes, elle flocule. Ce résultat est obtenu non seulement avec les sérums de paludéens mais aussi avec presque tous les sérums normaux. Le mécanisme de cette réaction est le suivant: on sait, d'après Vlès et Coulon [104] que le sérum possède trois points isoélectriques, l'un compris entre pI 9,0 et 12,0, l'autre à environ pH 5,4 et le troisième au-dessous de pI 5.0. En opérant à pH 5,4-5,5 on se trouve précisément à l'un des trois points où la stabilité d'une des fractions protéiques passe par un minimum et où l'addition de substances colloïdales, de certains sels ou de suspensions diverses suffit à

déclencher la floculation. 5,4 étant le point le plus constant des points isoélectriques, on comprend que, dans l'expérience, presque tous les sérums répondent positivement [33].

Les solutions de sels acides à ce pH donnent des résultats analogues, comme l'a vu Trenszt [96], avec une solution de phosphate monobasique d'ammonium à 10 ou 15 p. 4.000. Nous avons constaté que le sérum flocule toujours, même dans des solutions hypertoniques de phosphates à 5 et 10 p. 100. Seule agit la concentration en ions hydrogène.

Il est évident qu'on peut imaginer toute une série de cas où la réaction à la mélanine se montre positive en utilisant un précipitant quelconque de protéines actives. C'est ainsi que Trenszt [97], en additionnant un sérum positif non dilué d'une faible dose d'acide phénique ou de mélanine solubilisée, observe une floculation plus ou moins intense. Nous avons répété cette expérience à l'aide de mélanine non dissoute et nous avons obtenu comme lui un résultat positif. Ici, le facteur actif n'est point la mélanine, mais le phénol. L'opacification, car nous n'avons jamais observé de véritable floculation, apparaît avec les sérums paludéens, mais plus nettement encore avec les sérums tuberculeux précipitables à la résorcine. Si, au lieu de mélanine, on se sert de carmin légèrement phéniqué, on obtient une floculation, ou mieux, une opacification identique à celle de Trenszt. Cette observation prouve sans conteste que l'élément actif dans cette réaction est non pas la mélanine, mais l'acide phénique, la mélanine n'intervenant que pour intensifier la précipitation préexistante. La seule conclusion qu'on puisse tirer de cette expérience, c'est que les sérums paludéens, comme les sérums tuberculeux, sont plus facilement précipitables par les phénols que les sérums normaux.

L'instabilisation ou la précipitation préalable de certaines fractions protéiques du sérum importe seule dans toutes ces réactions dont on pourrait multiplier le nombre à l'infini.

Mais on n'est autorisé à désigner aucune d'entre elles sous le nom de réaction de Henry, car elles n'ont avec celle-ci qu'un point commun : la précipitation de la mélanine ou de tout autre indicateur.

Nous avons vu plus haut que le carmin est susceptible de jouer dans une réaction d'opacification le même rôle que la

mélanine. Ce même corps est utilisable dans la réaction à l'eau distillée ; il n'est d'ailleurs pas seul, un grand nombre d'autres corps se montrent sensiblement équivalents. Toutes les substances à poids moléculaire élevé, colloïdales ou pulvérulentes pourraient être utilisées à condition de présenter une charge électrique qui, d'après Prudhomme [83], doit être négative pour un pH de 7 à 9. Il convient aussi que les solutions ou suspensions en soient d'une faible concentration moléculaire et sensiblement neutre.

On voit qu'il est possible de trouver plusieurs centaines de réactions pour le paludisme en utilisant l'une ou l'autre de ces substances. La plus pratique est sans doute la suspension de carmin qui peut être très facilement préparée dans n'importe quel laboratoire, même très mal outillé.

MÉCANISME CHIMIQUE DE LA RÉACTION.

Trensz, le premier, a clairement posé la question de l'augmentation des euglobulines comme facteur de la mélanofloculation. Plus tard, Trensz, en collaboration avec M^{lle} Jardon [93], a essayé de doser les euglobulines sans arriver à en préciser le rôle, car si la réaction positive s'accompagne généralement d'une augmentation des euglobulines dans le sang, on trouve cependant des sérums négatifs très riches en euglobulines.

Quand nous avons repris cette question, nous nous sommes heurté à l'imprécision qui entoure la constitution chimique du sérum et qui complique singulièrement le problème. Les fractions protéiques du sérum qui précipitent sous l'action de sulfate d'ammonium neutre à demi-saturation, sont désignées sous le nom de *globulines*, les autres fractions précipitables à saturation s'appellent sérines ou albumines. Les sérines sont en totalité solubles dans l'eau distillée, les globulines ne le sont qu'en partie. Les fractions des globulines insolubles dans l'eau distillée ont reçu le nom d'euglobulines, celles qui se dissolvent celui de pseudoglobulines. Le mode d'extraction des diverses fractions protéiques n'est pas toujours celui-ci. On peut obtenir les euglobulines par dialyse des globulines totales ou du sérum contre une grande quantité d'eau distillée, ou par précipitation au moyen de sels neutres, sulfate de

soude (Howe) [52] ou sulfate d'ammonium au tiers de saturation (Porges) [81]. Par ces méthodes, on retire des substances assez différentes et quand on parle d'euglobulines obtenues par l'une ou l'autre de ces méthodes, il est bien entendu que celles-ci ne sont pas identiques. Dans nos recherches, sauf des cas spéciaux mentionnés à part, nous nous sommes toujours servi des fractions protéiques obtenues par le sulfate d'ammonium et purifiées par dialyse (Hofmeister) [51]. Notre technique est la suivante : du sérum de cheval, d'homme ou de lapin, a été traité par le sulfate d'ammonium neutre à demi-saturation, puis soumis à la centrifugation ou filtré. Le précipité formé par les globulines purifié à deux ou trois reprises par dissolution dans l'eau distillée et précipité par le sulfate d'ammonium à demi-saturation est finalement dissous dans une petite quantité d'eau distillée. Nous dialysons ensuite les globulines à travers un sac de collodion pendant trois ou quatre jours contre une grande quantité d'eau distillée changée trois ou quatre fois par jour. Déjà, au bout de vingt-quatre heures, on voit apparaître dans le sac de collodion un dépôt formé par les euglobulines, dans le sens de Marcus Émil [70], qui sont entièrement séparées en quarante-huit heures ; le liquide surnageant contient en solution les pseudoglobulines.

Le reliquat de notre premier traitement renferme les sérines qu'on précipite à leur tour par le sulfate d'ammonium à saturation et qu'on dialyse dans un sac de collodion contre une grande quantité d'eau distillée. Dans nos premières expériences, nous avons desséché ces diverses fractions. Pour l'emploi, nous les réduisons en poudre par broyage dans un mortier d'agate. Les pseudoglobulines ainsi préparées se dissolvent lentement dans l'eau distillée, mais les euglobulines y restent insolubles. Même dans les solutions salines, elles ne se dissolvent qu'imparfaitement. Elles subissent donc des modifications chimiques assez importantes. Plus tard, nous n'avons plus desséché les euglobulines, mais les avons directement mélangées aux sérums sur lesquels portaient nos expériences. La quantité d'euglobulines introduites dans le sérum a été mesurée par dosage des protéines totales du sérum, avant et après l'addition de ces euglobulines, par la méthode de Kayser. Les résultats obtenus par ce procédé sont plus

exacts parce qu'on travaille avec une substance que n'a pas modifiée la dessiccation.

L'ADDITION DES GLOBULINES TOTALES ET DESSÉCHÉES AUX SÉRUMS NÉGATIFS LES REND POSITIFS [25, 31, 34]. — L'expérience a été faite surtout avec le sérum de cheval, mais aussi avec le sérum

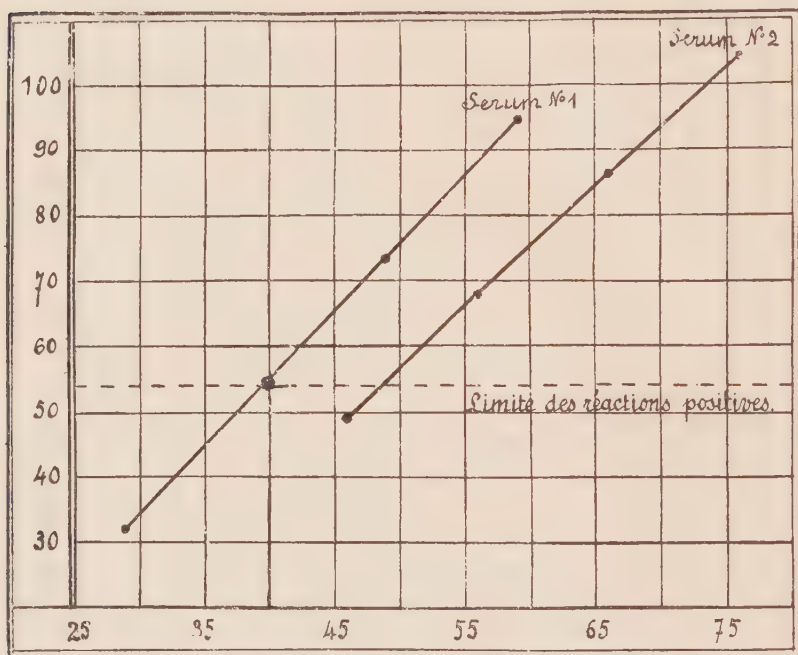


FIG. 3. — En ordonnées, degrés photométriques de la réaction; en abscisse, quantité de globulines par litre en grammes. Chacun des points de la courbe correspond à l'addition de 10 grammes de globulines par litre.

d'homme ou de lapin, chaque sérum recevant des euglobulines homologues.

A 5 ou 10 cent. cubes de sérum, on ajoute des globulines en proportion de 10, 20 et 30 grammes par litre. Après mélange, on porte les sérums à la température de 37° pendant deux heures et on les centrifuge. Il reste un faible reliquat. Nous avons obtenu des résultats toujours concordants dans les nombreuses expériences faites soit avec le sérum de cheval, soit avec le sérum de l'homme. L'addition des globulines totales

aux sérums négatifs les rend positifs, et l'intensité de la réaction est proportionnelle à la quantité de globulines additionnée quelle que soit celle qui est normalement contenue dans le sérum. Les deux expériences faites avec le sérum de cheval se trouvent représentées par le graphique ci-contre. Le premier de ces sérums contenait normalement 29 grammes de globulines, l'autre, 46 gr. 3. L'addition au sérum de 10 grammes de globulines confère à chacun d'eux le caractère positif. L'instabilité du sérum ne dépend donc pas de la teneur absolue en globulines, mais de l'augmentation de celles-ci sans modification des autres constituants du sérum.

Les *pseudoglobulines* sont sans action sur la réaction. Nous avons vu qu'on peut séparer les globulines en deux fractions, une soluble dans l'eau distillée, les pseudoglobulines — ; l'autre insoluble, les euglobulines.

Si on ajoute à un sérum normal d'homme ou de cheval des pseudoglobulines à doses croissantes, on ne constate aucune modification de la réaction comme le montre l'expérience ci-dessous.

Quatre tubes contiennent chacun 10 cent. cubes de sérum de cheval négatif.

Dans trois de ces tubes, on ajoute une quantité de pseudoglobulines correspondant respectivement à 5, 10 et 15 grammes par litre, le quatrième tube reste comme témoin. Voici le résultat de la réaction de Henry pratiquée avec ces quatre sérums.

	DEGRÉS PHOTOMÉTRIQUES	
	En eau distillée	En eau salée
Sérum normal	42	32
Sérum + 5 grammes de pseudoglobulines par litre.	42	32
Sérum + 10 grammes de pseudoglobulines par litre.	41	32
Sérum + 15 grammes de pseudoglobulines par litre	43	33

Par conséquent, les pseudoglobulines n'intensifient pas la réaction. Nous avons même constaté que l'addition de pseudoglobulines à des sérums paludéens et positifs affaiblit plutôt l'intensité de la réaction.

EUGLOBULINES DESSÉCHÉES. — Dans trois tubes contenant chacun 10 cent. cubes de sérum de cheval normal, on ajoute une quantité d'euglobulines correspondant respectivement à 5, 10 et 15 grammes par litre. Comme nous le disons plus haut, tout ne se dissout pas. Nous clarifions à la centrifuge le sérum légèrement troublé et nous le décantons. Nous pratiquons ensuite la réaction de Henry.

	DEGRÉS PHOTOMÉTRIQUES	
	En eau distillée	En eau salée
Sérum normal témoin	42	32
Sérum + 5 grammes d'euglobulines par litres	59	42
Sérum + 10 grammes d'euglobulines par litres	89	56
Sérum + 15 grammes d'euglobulines par litre	Illisible au phot.	72

Nous voyons par opposition avec le tableau précédent le rôle actif que les euglobulines jouent dans la réaction de Henry. Celles-ci, nous le faisons amplement ressortir plus haut, dénoncent l'instabilité du sérum dans l'eau distillée.

EUGLOBULINES NON DESSÉCHÉES. — Sous cette forme l'action de ces protéines se marque encore beaucoup plus nettement.

On ajoute à un sérum de cheval normal contenant 36 grammes de globulines et 42 grammes de sérines par litre des doses croissantes d'euglobulines fraîches; la réaction de Henry et la floculation dans l'eau distillée donnent au photomètre de V. B. Y. les chiffres suivants :

	RÉACTION de Henry	FLOCULATION dans l'eau distillée
Sérum normal	43	21
Sérum normal + 2,5 d'euglobulines	50 ±	40
Sérum normal + 5 d'euglobulines	59 +	46
Sérum normal + 10 d'euglobulines	62 +	65
Sérum normal + 15 d'euglobulines	70 +	83

RÔLE DES GRAISSES ET DE LA CHOLESTÉRINE. — Comme il fallait s'y attendre, la floculation dans l'eau distillée varie parallèlement avec la floculation de Henry. Il est évident que l'instabi-

lité du sérum manifestée par la floculation ne peut être due qu'aux fractions insolubles dans l'eau distillée qui y sont contenues. Les euglobulines ne sont pas les seuls éléments insolubles.

Les graisses, la cholestérine interviennent à ce titre dans la réaction de Henry.

Nous avons vu en collaboration avec Gillier [25] que l'addition de lécithine transforme un sérum négatif en sérum positif.

Ces expériences ont porté soit sur la lécithine de soja, soit sur la lécithine de jaune d'œuf. Dans une quantité de sérum déterminée nous ajoutons de la lécithine en proportion de 1, 2 et 3 grammes par litre. Pour obtenir un sérum clair, le mélange a été bien agité et conservé à la température de 37° pendant une ou deux heures. Nous centrifugeons le sérum pour le clarifier et nous le filtrons sur papier. Finalement la quantité de lécithine retenue dans le sérum est de beaucoup inférieure à celle qu'on y a introduite. Voici les résultats d'une de nos expériences faites avec un sérum de cheval additionné de lécithine de soja.

Sérum normal	32	27
Sérum normal + 1 gramme de lécithine par litre. . .	43	38
Sérum normal + 2 grammes de lécithine par litre . .	50,5	47
Sérum normal + 3 grammes de lécithine par litre . .	55,5	54

La très faible quantité de lécithine retenue par le sérum indique l'influence considérable que ce corps est susceptible d'exercer dans la réaction.

La cholestérine augmente de même l'intensité de la mélanofloculation. La cholestérine du commerce purifiée reste pratiquement insoluble dans le sérum. Il s'en dissout à peine 0 gr. 4 par litre. Cette petite quantité suffit déjà à élever de 3° à 6° la mesure photométrique de la réaction qui passe de 49° à 55° ou de 37° à 41° dans nos expériences.

Mais l'action de ce produit varie considérablement suivant qu'on l'y introduise artificiellement ou qu'il y soit normalement contenu. Des sérums contenant jusqu'à 4 gr. 60 de cholestérine par litre se sont montrés négatifs aussi bien vis-à-vis de la mélanine que de l'eau distillée. C'est évidemment parce que

ce corps se trouve dans le sérum sous forme de complexes protéiques. Ce complexe comme les complexes lipo-protéiques sont souvent très solubles dans l'eau [68, 87] et par conséquent demeurent inactifs dans la réaction. Il en résulte que ce n'est pas tellement la quantité de graisses et de cholestérine qui importe, mais la forme sous laquelle se trouvent ces substances.

ACTION DE L'ÉTHER. — Dans le paludisme, on observe fréquemment une hypcholestérinémie plus ou moins accusée sans que le sens de la réaction se modifie [106]. Cependant si l'on traite un sérum par l'éther, le degré photométrique de la réaction baisse sensiblement. Les substances solubles dans l'éther ne se montrent donc pas inactives.

Voici le résultat de nos expériences : à 3 cent. cubes de sérum on mélange 15 cent. cubes d'éther et on agite fortement d'abord, puis de temps en temps pendant les deux heures qu'on le garde à l'étuve. L'éther est alors décanté et ce qui reste dans le sérum est extrait à la trompe. La réaction à la mélanine est alors pratiquée dans l'eau distillée.

	DEGRÉS photométriques	DIFFÉRENCE
1° Sérum de paludéen avant lavage à l'éther .	72	— 18
Sérum de paludéen après lavage à l'éther .	54	
2° Sérum de paludéen avant lavage à l'éther .	56	— 12
Sérum de paludéen après lavage à l'éther .	44	
3° Sérum de paludéen avant lavage à l'éther .	68	— 16
Sérum de paludéen après lavage à l'éther .	52	
4° Sérum de paludéen avant lavage à l'éther .	77	— 22
Sérum de paludéen après lavage à l'éther .	55	
5° Sérum de paludéen avant lavage à l'éther .	54	— 14
Sérum de paludéen après lavage à l'éther .	40	
6° Sérum normal avant lavage à l'éther	38	— 4
Sérum normal après lavage à l'éther	34	
7° Sérum normal avant lavage à l'éther	42	— 5
Sérum normal après lavage à l'éther	37	
8° Sérum normal avant lavage à l'éther	36	— 3
Sérum normal après lavage à l'éther	33	
9° Sérum normal avant lavage à l'éther	45	— 5
Sérum normal après lavage à l'éther	40	

Nous voyons par le tableau ci-dessus que l'action de l'éther

est plus énergique pour les sérums de paludéens que pour les sérums normaux.

Benhamou et Gille [7] objectent dans une de leurs dernières notes que la baisse de la tension superficielle sous l'influence de l'éther suffirait à faire baisser le titre de la réaction. L'expérience ne justifie pas cette opinion, car la purification la plus rigoureuse du sérum lavé à l'éther ne rend pas d'intensité à la réaction, et inversement l'addition de III gouttes d'éther par centimètre cube de sérum n'entraîne aucune modification de la réaction malgré une baisse importante de la tension superficielle [36].

Nous nous sommes assuré d'autre part, que l'éther n'influence pas les euglobulines. Un sérum normal a été traité à l'éther et ensuite additionné d'euglobulines dans la proportion de 10 grammes par litre. Une partie de ce sérum a été soumise une deuxième fois à l'action de l'éther; l'expérience nous a donné les chiffres suivants :

Sérum traité à l'éther + globulines.	70
Sérum traité à l'éther + globulines et traité à nouveau par l'éther	80

L'éther ne modifie pas l'action des euglobulines.

Henry remarque que le sang de l'homme en digestion trouble la réaction; on peut avoir une réaction négative à jeun et positive après le repas.

Les substances extractibles par l'éther jouent donc un rôle très important dans ce cas.

ACIDE URIQUE. — D'autres corps possèdent la propriété de se montrer plus solubles dans le sérum que dans l'eau distillée et doivent jouer un rôle adjuvant dans la réaction. Parmi ces corps on peut citer l'acide urique. Mais la quantité si faible qu'en renferme le sérum en rend l'action presque négligeable par rapport aux euglobulines et aux substances extractibles par l'éther.

ACTION DES SÉRINES. — Quand on ajoute des sérines en quantités croissantes à un sérum paludéen, on constate que la réac-

tion s'affaiblit progressivement. Souvent 5 grammes de sérines par litre de sérum suffisent pour entraver complètement la réaction.

Les sérums normaux enrichis en sérines doivent pour le même motif être additionnés d'euglobulines à dose beaucoup plus forte que celle qu'il eût fallu employer avec les mêmes sérums non additionnés de sérines, si l'on veut qu'ils donnent une réaction positive. Voici les chiffres que nous avons obtenus avec le sérum de cheval négatif à la mélanine et contenant normalement 36 grammes de globulines et 42 grammes de sérines par litre; ce sérum additionné de 2 grammes d'euglobulines devient positif; ce même sérum additionné au préalable de 20 grammes de sérines par litre demande 12 grammes au lieu de 2 grammes d'euglobulines pour donner un résultat positif à la mélanine. On voit donc que les sérines sont des substances inhibitrices et que le rapport sérines-euglobulines influe fortement sur la réaction.

En somme, la réaction de Henry dénote un déséquilibre lipo-protéique du sérum dont les facteurs sont d'abord l'augmentation des euglobulines, puis la diminution des sérines et enfin la présence des graines et de la cholestérine libres ou incluses dans des complexes instables dans l'eau distillée.

LA CONCENTRATION MOLÉCULAIRE DU SANG EST UN RÉGULARISATEUR DE LA RÉACTION.

Certains corps actifs dans la réaction qui ne sont pas solubles dans l'eau distillée se dissolvent dans les solutions salines étendues. On conçoit donc l'importance pour cette opération des sels contenus dans le sérum. Voici à titre d'exemple une des expériences qui prouvent ce que nous avançons :

On a pris du sérum de cheval négatif, rendu plus flocculable par addition de globulines à la dose de 5 grammes par litre. Une partie de ce sérum a été dialysée à travers un sac de collodion dans une grande quantité d'eau distillée. On a prélevé de demi-heure en demi-heure une partie du sérum pour la réaction. Le reste du sérum a été réparti en tubes et additionné de chlorure de sodium, le premier tube dans la proportion de 1 gramme par litre, le deuxième de 3 grammes, le troisième de 5 grammes et le quatrième de 10 grammes par litre. La concentration moléculaire a été toujours mesurée

par la méthode cryoscopique. On a pratiqué la réaction avec tous ces sérums et les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

	Δ en degrés	RÉACTION en eau distillée	RÉACTION en eau salée
Sérum dialysé pendant deux heures.	— 0,03	59,0	40,5
Sérum dialysé pendant une heure et demie	— 0,13	57,0	38,5
Sérum dialysé pendant une heure .	— 0,230	52,5	36,5
Sérum dialysé pendant une demi- heure	— 0,365	51,0	34,5
Sérum normal.	— 0,59	49,0	31,5
Sérum + 1 gramme de NaCl p. 1.000.	— 0,62	74,0	28,5
Sérum + 3 grammes de NaCl p. 1.000.	— 0,71	46,0	26,5
Sérum + 5 grammes de NaCl p. 1.000.	— 0,90	44,0	26
Sérum + 10 grammes de NaCl p. 1.000.	— 1,20	33,5	23

Comme on le voit, l'intensité de la réaction diminue avec l'augmentation de la concentration moléculaire du sérum.

CHAUFFAGE DU SÉRUM [24].

Les sérums positifs de paludéens chauffés à 55° pendant une demi-heure cessent de flocculer dans l'eau distillée formolée et de ce fait la mélanoflocculation se trouve entravée. Les sérums, rendus positifs par addition de globulines, de lécithine ou d'acide urique, deviennent aussi négatifs après avoir été chauffés dans les mêmes conditions, comme nous le voyons d'après les chiffres ci-dessous :

	RÉACTION en eau distillée	RÉACTION en eau salée
Sérum normal	42	26,5
Sérum + globulines	89,5	54,4
Sérum + globulines, chauffés.	44,5	27
Sérum + lécithine	60	56
Sérum + lécithine, chauffés	47	36

Comment peut-on expliquer l'action du chauffage?

Premièrement nous avons supposé que la concentration moléculaire du sérum pouvait varier. L'expérience nous a montré que le $\Delta = -0^{\circ}58$ d'un sérum est resté le même après chauffage. *La concentration moléculaire ne subit donc pas de modification par chauffage à 55°.*

Les globulines chauffées deviendraient-elles plus solubles dans l'eau? L'expérience a montré que la solution chauffée à 55° de globulines dans l'eau physiologique est aussi précipitable par l'eau distillée que la solution non chauffée.

Nous nous sommes demandé si une partie des globulines ne serait pas détruite par la chaleur. Mais le dosage, avant et après chauffage, donne la même quantité de globulines.

La différence ne dépasse pas l'erreur expérimentale.

	GRAMMES par litre
1° Sérum de paludéen avant chauffage	28,68
Sérum de paludéen après chauffage	29,3
2° Sérum de paludéen avant chauffage	39,76
Sérum de paludéen après chauffage	48,2
3° Sérum de paludéen avant chauffage	49,96
Sérum de paludéen après chauffage	48,82
4° Sérum de cheval avant chauffage.	42,32
Sérum de cheval après chauffage.	43,34
5° Sérum de cheval avant chauffage.	49,68
Sérum de cheval après chauffage.	47,96

Les euglobulines ne sont pas plus influencées; la dialyse des globulines d'un même sérum, chauffé ou non, donne la même quantité d'euglobulines.

La lécithine, l'acide urique et la cholestérine ne subissent pas d'altération à cette température (55°).

Les substances actives existent donc toujours en même quantité dans le sérum chauffé. Cependant, quand on dialyse un sérum normal et le même sérum récemment chauffé à 55°, on constate que les euglobulines se déposent en vingt-quatre heures dans le premier cas et seulement en soixante-douze heures dans le second.

Pour tenter de savoir à quoi est due cette stabilité du sérum chauffé, nous prenons un sérum normal dont une partie est chauffée à 55° pendant une demi-heure et nous ajoutons 10 grammes par litre de globulines dans l'un et dans l'autre. La réaction dans l'eau distillée pratiquée avec le sérum normal est égale à 41°. Après l'addition de globulines, elle passe à 69°. Pour le sérum chauffé, on a respectivement 34° et 43°. Dans le premier cas, le degré photométrique de la réaction présente une différence de 28°; dans le deuxième cas, seulement de 11°.

Les globulines incorporées dans le sérum chauffé précipitent donc plus difficilement sous l'action de l'eau distillée.

Il résulte de cette expérience qu'une même quantité d'euglobulines incorporée dans nos deux sérums y produit des effets tout différents. Cette observation ne permet pas d'accepter l'hypothèse de Trenszt qui veut que, dans le sérum enrichi par des euglobulines, ce soient les euglobulines ajoutées qui seules précipitent, le reste du sérum n'intervenant pas dans la réaction.

Nous avons fini par découvrir avec Prudhomme la cause la plus importante de cette paralysie de la réaction. Elle est due à l'alcalinisation du sérum par départ de CO_2 sous l'influence du chauffage. Il suffit de ramener par addition de CO_2 le pH du sérum chauffé à ce qu'il était avant chauffage pour que ce sérum floccule de nouveau avec la même intensité qu'auparavant. Cette expérience démontre que le pH joue un rôle d'une importance primordiale et que la zone de pH où se produit la floculation est bien plus restreinte qu'on ne pouvait le supposer d'après les expériences de Trenszt : de 5,4 à 9.

APPLICATION CLINIQUE DE LA RÉACTION.

D'après tout ce que nous savons de la réaction de Henry, l'application clinique s'en trouve légèrement modifiée. Au point de vue technique, il revient au même de mesurer la floculation du sérum en eau distillée pure ou additionnée de divers indicateurs. Nous donnerons ci-dessous les diverses méthodes employées et l'interprétation qu'on en peut tirer.

RÉACTION AVEC INDICATEURS.

L'utilisation d'indicateurs trouve sa raison d'être dans les laboratoires qui ne possèdent pas de photomètre.

Parmi les substances proposées par les divers auteurs : mélanine des yeux de bœufs non dissoute, ou dissoute par l'antiformine (Henry) [50] ou par action alternative de soude et d'acide (Trenszt) [95], la mélanine de cheveux dissoute ou non (Henry, Greig, Van Rooyen, Hendry) [49], celle de seiche (Liviérato, Vagliano et Constantakato) [62], l'albuminate de fer,

le métharfer de Bouty (Henry) [50], le bleu de méthylène, le rouge de phénol, le rouge de méthyle (Greig, Hendry et Van Rooyen) [49], l'émulsion microbienne ou tout simplement la suspension du carmin dans l'eau distillée (Prudhomme) [83], deux présentent un intérêt pratique, ce sont la mélanine extraite des yeux de bœufs non dissoute qu'Henry utilise pour sa réaction de longue date, dont la valeur a été vérifiée à peu près dans tous les pays, et la suspension de carmin. La mélanine présente l'inconvénient d'être d'une préparation et d'un titrage délicats. C'est pourquoi nous croyons que le carmin pourra remplacer avantageusement la mélanine dans les laboratoires où la préparation de celle-ci est difficile à réaliser.

Parmi les autres indicateurs, certains sont d'une préparation encore plus délicate sans présenter un avantage quelconque sur la mélanine d'Henry ; certains autres se sont montrés moins sensibles et sont pratiquement abandonnés.

L'indicateur à utiliser doit être neutre, d'une concentration moléculaire faible pour ne pas gêner la précipitation des euglobulines, et autant que possible inerte pour éviter les réactions étrangères entre l'indicateur lui-même, le sérum et les sels utilisés. Evidemment, les réactions ne seront pas identiques dans un mélange de sérum + sels minéraux + colloïde étranger et dans un mélange de sérum + sels minéraux + substance inerte. Les réponses fournies par ces deux méthodes ne seront pas forcément identiques dans tous les cas. C'est pour ces raisons que nos préférences vont au carmin et à la mélanine des yeux de bœufs non dissoute, qui ne contiennent que les substances protéiques de l'organisme non dénaturées, et ne se comportant pas très différemment de celles du sérum. Le carmin possède l'avantage indéniable d'être d'une préparation très facile même pour les laboratoires les plus mal outillés.

Voici la technique de la réaction au carmin qui ne diffère de celle de Henry que par l'indicateur :

1° PRÉPARATION DE LA SUSPENSION DE CARMIN [83] : Environ 0 gr. 5 de carmin R. A. L. n° 40 finement broyés dans un mortier sont agités fortement pendant cinq minutes dans un ballon à perles, à sec. On ajoute alors 1 cent. cube d'eau distillée et on agite à nouveau deux minutes. Au bout de ce temps, on

additionne encore le mélange d'eau distillée (25 cent. cubes) et on le secoue encore vivement pendant deux minutes. La suspension est centrifugée doucement pendant une minute pour éliminer les particules les plus grosses. Le liquide surnageant est étendu d'eau distillée de telle sorte que, dilué au 1/10 il donne au photomètre une opacité de 30° plus forte que celle de la cuve remplie d'eau.

Dans les laboratoires ne possédant pas de photomètre de V. Y. B. on opère ainsi : on dilue 0 gr. 015 de fuchsine basique R. A. L. dans 100 cent. cubes d'alcool absolu ; cette solution diluée dans l'eau distillée à raison de 0 c.c. 5 pour 10 d'eau donne la teinte, observée sur fond blanc, à laquelle doit être ramenée la suspension de carmin diluée au 1/10 et qui alors correspond à une opacité photométrique égale environ à celle de la préparation précédente.

2° On alcalinise l'eau distillée en ajoutant à 100 cent. cubes d'eau, 0 c.c. 25 de soude à 1/100 N.

3° On prépare une solution de formol du commerce à 1 p. 200.

Ces solutions ne peuvent être conservées que pendant une à deux semaines au maximum.

Au moment de la préparation de la réaction, on prend deux tubes : dans le premier A, on met 8 cent. cubes d'eau distillée alcalinisée + 1 cent. cube de formol à 1 p. 200 + 1 cent. cube de suspension de carmin.

Dans le deuxième tube, B, on place 9 cent. cubes d'eau distillée alcalinisée + 1 cent. cube de formol à 1 p. 200.

Réaction. — Elle se fait dans deux tubes à hémolyse.

Dans le premier on met 1 cent. cube du contenu du tube A ;

Dans le deuxième, 1 cent. cube de la dilution du tube B.

Les deux tubes sont additionnés de 0 c.c. 2 de sérum à examiner, bien mélangés sans produire de bulles d'air, bouchés au liège et mis à l'étuve à 37° C pour trois heures.

Retirés de l'étuve, on les laisse à la température du laboratoire une demi-heure et on procède à la lecture.

Trois cas peuvent se présenter :

1° Des réactions très positives : on voit une floculation plus ou moins abondante dans les deux tubes.

2° Le tube témoin sans carmin reste clair ; celui qui renferme

le carmin présente une floculation plus ou moins apparente. Il y a réaction positive d'intensité moyenne.

3° Les deux tubes restent tels qu'ils étaient au moment de la préparation et ne présentent aucune floculation. Ce sont des réactions négatives.

TECHNIQUE DE LA RÉACTION SANS INDICATEUR.

La réaction à l'eau distillée est d'une pratique très simple, mais elle exige pour les lectures le secours du photomètre de Vernes.

Après plusieurs essais faits, soit avec Prudhomme, soit M^{lle} Koechlin [26, 27 et 34], nous nous sommes arrêté à la technique suivante qu'il est nécessaire d'appliquer rigoureusement pour obtenir des résultats probants.

1° PRISE DE SANG. — Elle doit être faite de préférence à jeun et en dehors de toute période fébrile.

2° CONSERVATION DU SANG. — La réaction doit être pratiquée vingt-quatre heures après la prise de sang. Celui-ci doit être conservé à la glacière et le sérum n'être séparé du caillot qu'au moment d'exécuter la réaction. Il ne faut utiliser que des sérums parfaitement liquides, débarrassés des globules rouges par centrifugation et non chauffés.

3° PRATIQUE DE LA RÉACTION. — La verrerie doit être chimiquement pure, lavée au mélange sulfo-chromique. On se sert, pour chaque réaction de deux tubes à hémolyse. On met dans chaque tube 1 c.c. 8 d'eau distillée. Puis dans le premier, on ajoute 0 c.c. 2 de sérum à examiner; après avoir mélangé le contenu en évitant de produire de la mousse, on verse rapidement le mélange dans la cuve du photomètre et on fait la première lecture. A ce moment on procède de même pour le deuxième tube. On a ainsi 2 tubes identiques qui se contrôlent l'un par l'autre.

Il est indispensable d'opérer séparément sur les deux tubes parce que certains sérums floclent très vite. C'est pour la même raison que les lectures doivent succéder aussi rapidement que possible à l'introduction du sérum pathologique dans le tube.

Ensuite les tubes dans lesquels, après la lecture photométrique, a été reporté le mélange, sont bouchés au liège, placés à l'étuve à 37°C pour trois heures. Retirés de l'étuve, on les laisse à la température du laboratoire pendant vingt minutes et l'on procède à la deuxième lecture du photomètre. Le chiffre de la réaction s'obtient en soustrayant celui de la première lecture de celui de la deuxième. La différence entre les deux tubes d'un même sérum ne doit pas dépasser 2 à 3 degrés photométriques quand la réaction est bien exécutée; dans le cas contraire, il est nécessaire de refaire la réaction.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

1° Les chiffres inférieurs à 10 indiquent qu'on a affaire à un sérum non paludéen.

2° Les chiffres de 10 à 20 doivent être considérés comme suspects.

Cette zone de floculation correspond à certains sérums syphilitiques, tuberculeux, et aussi à quelques sérums paludéens. Les paludéens, surtout porteurs de *P. præcox*, qui prennent de la quinine préventive régulièrement, et qui, bien que parasités, n'ont présenté que peu ou pas d'accès francs, entrent dans ce groupe.

3° Les chiffres supérieurs à 20, jusqu'à 100 et rarement plus, indiquent généralement un sérum paludéen. Le nombre des sérums non paludéens qui floculent dans l'eau distillée avec cette intensité est très faible.

4° Les sérums de kala-azar se montrent encore plus instables dans l'eau distillée. La floculation est massive d'emblée. La première lecture égale à 250-300 et souvent même plus, au lieu de 140-200 comme pour les autres sérums, la différence entre les deux lectures dépassant 100 sont deux signes de présomption d'une affection viscérale à leishmanies. Dans le cas d'une floculation très intense, il est nécessaire, comme nous l'avons déjà dit plus haut, d'agiter le tube de temps en temps pendant qu'il est à l'étuve afin d'éviter l'adhérence du précipité au verre, ce qui pourrait fausser la lecture.

Dans notre réaction, la limite de positivité est abaissée par rapport à la réaction de la mélanine. Les raisons qui

nous ont poussés à accepter ces chiffres sont les suivantes :

On sait que la réaction à la mélanine se trouve rarement positive en dehors du paludisme et de quelques autres affections (maladies à protozoaires, spirochètoses) ; cependant, de nombreux auteurs ont vu la réaction à la mélanine être très faible, ou même négative, au cours du paludisme. Si l'on tient compte des fautes de technique, ces cas se montrent avec une très grande rareté. Aussi nous avons pensé qu'on peut considérer une réaction négative comme un critérium éliminatoire du paludisme. Jusqu'à présent, nos observations qui portent sur plus de 200 malades nous permettent d'affirmer qu'un sérum présentant une floculation dans l'eau distillée inférieure à 10 n'appartient sûrement pas à un paludéen, quand la prise de sang a été faite en dehors de l'accès fébrile.

APPLICATION CLINIQUE DE LA RÉACTION.

1° Évolution de la réaction de Henry au cours du paludisme [24].

L'évolution de la réaction de Henry au cours de l'infection palustre a été étudiée sur les paralytiques généraux impaludés dans un but thérapeutique. Nous avons constaté que chez ces malades impaludés par injection de sang, la mélano-floculation est souvent positive avant le premier accès, dans le cas où la période d'incubation dépasse quatre à cinq jours ; elle croît ensuite d'intensité, régulièrement, jusqu'au cinquième ou septième accès où elle atteint son maximum. Nos malades ont été traités à la quinine au huitième accès. Après cessation de toute fièvre, la malaria-floculation reste à son maximum d'intensité pendant sept à dix jours et ensuite décroît régulièrement. Dans le cas de guérison, elle devient négative trente à cinquante jours après le commencement du traitement quinique. Chez les paludéens infectés par piqûres d'anophèles, elle disparaît plus lentement en quarante à soixante-dix jours. Alcaÿ, Cattoir et Marill [4] en Algérie, Le Bourdelles et Fribourg-Blanc, au Val-de-Grâce [58] ont fait des constatations analogues.

Avec la quinacrine, la réaction devient négative plus rapidement qu'avec la quinine. Nous avons vu des malades dont le

sérum donnait une réaction négative vingt-sept jours après le commencement du traitement.

La floculation dans l'eau distillée suit la même marche qu'avec la mélanine. A partir du quatrième ou cinquième accès, le sérum flocule spontanément à 1 p. 5 dans l'eau distillée.

Le traitement influence pareillement les deux floculations.

Henry d'abord, et tous les expérimentateurs ensuite, ont observé qu'au moment de l'accès la réaction devient négative. Par prises de sang successives sur le même malade, nous avons établi que l'affaiblissement ou la disparition de la réaction précède de peu l'ascension thermique, et dure presque jusqu'à l'acmé. La réaction redevient positive dès que la température descend. Le mécanisme de cette action est le suivant :

Si l'élévation de la température du malade n'entrave pas la réaction, si la quantité d'euglobulines ne manifeste aucune variation appréciable au cours de l'accès, la concentration moléculaire au contraire subit des écarts notables. Les mesures que nous avons faites pendant l'apyrexie et au moment de l'accès nous ont donné les chiffres suivants : en période d'apyrexie, le Δ du sérum est égal en moyenne à $-0^{\circ}55$, légèrement plus faible que le Δ du sérum normal ; au moment de l'accès, le Δ est égal à $-0^{\circ}62$ en moyenne, ce qui correspond à une élévation de la concentration moléculaire égale environ à 2 grammes de NaCl par litre. En diminuant par dialyse la concentration moléculaire du sérum prélevé au moment de l'accès, on enlève l'excès de sel et la réaction devient positive.

L'augmentation de la concentration moléculaire au cours de l'accès est produite par la destruction des globules rouges parasités qui sont riches en potassium. En effet, ce corps a été retrouvé dans le sérum, chez les paludéens en accès, en quantité beaucoup plus grande qu'en apyrexie par Pinelli [80] et Andriadze [5]. Expérimentalement, nous avons établi que les sels de potassium exercent sur la solubilité des euglobulines, à la même concentration moléculaire, une action légèrement supérieure à celle des sels de sodium.

On sait aussi qu'après l'accès, les urines des paludéens se chargent en potassium. Très vite la concentration du sang baisse jusqu'à la normale par régulation rénale, en même temps que la réaction redevient positive.

APPLICATION PRATIQUE DE LA RÉACTION.

La valeur clinique de la mélanofloculation est bien démontrée par les travaux d'Adida [3], de Biasiotti [8], Bonalberti [9], Bonnet [10], de Brotzu [12], de Cartana Castella [15], de Chorine [22, 28 et 30], de Coradetti [39], de Dhont [40], de Farjot [41], de Henry, de Greig et ses collaborateurs [49], de Lavergue et Monier [56], de Le Bourdelles et ses élèves, Chabrelié [60, 17], Fribourg-Blanc [58], Liégeois et Velluz [59, 61], de Livierato et Salata [63], de Kapsus [53], de Meersseman et Lacour [72], de Marchoux [69], de Nanni [74], de Pozzi [82], de Rodillon [85], de Sabatucci [86], de Théobald [89], Tzecnovitzer et ses collaborateurs [100], de Vialatte et Ramolet [103], de Voigtlander [105], de Treusz [97], etc.

Tous ces auteurs sont d'accord pour reconnaître que les sérums paludéens répondent positivement à la mélanine, mais presque tous ont observé des réactions positives en dehors du paludisme. La proportion des réactions positives spécifiques et non spécifiques varient suivant les auteurs dans des proportions très larges. Cette différence est principalement due aux défauts des préparations de mélanine. Nos observations nous conduisent à accepter 5 à 6 p. 100 de réactions positives non spécifiques avec la mélanine. Avec l'eau distillée ce pourcentage augmente à peine de 1 à 2 p. 100.

On comprend aisément qu'il soit possible de rencontrer des réactions positives en dehors du paludisme, car plusieurs maladies réalisent le même déséquilibre sérique.

La réaction de Henry donne un résultat positif, en dehors du paludisme, d'une façon constante dans le kala-azar viscéral (Henry, Chorine, Treusz), dans le typhus exanthématique où elle suit la réaction de Weill-Félix (Tzecnovitzer et ses élèves [99], Henry [50]), dans certains cas de cirrhose de Laennec (Chorine et Gillier [25]), de cirrhose de Hanot, d'ictère hémolytique, de septicémie streptococcique (Dhont [40]), parfois dans les leucémies (Nanni [74]), chez certains lépreux, rarement dans la fièvre typhoïde (Dhont [40]) et d'une façon inconstante dans la syphilis et la tuberculose (Le Bourdelles [57], Chorine [26], Farjot [41], Dhont [40], Voigt-

lander [105]). Chez les animaux on trouve la réaction positive dans la trypanosomiasse du cobaye (Trensz '91), et du lapin (Chorine et Gillier [25]), dans la leishmaniose canine (Trensz [91]), dans la fièvre exanthématique des lapins et des cobayes (Karout [54]), dans la spirochétose des poules (Chorine [23]), dans la tuberculose du cobaye (Chwatt '37) pour ne citer que ces seules affections.

Dès nos premières publications, nous avons insisté sur le fait que la réaction de Henry négative a plus de valeur que les réactions positives. Depuis, tous les travaux faits dans divers pays confirment notre opinion.

Nous admettons que la réaction négative est une épreuve éliminatoire de toute infection palustre, surtout quand elle est faite sans indicateur, car l'eau distillée employée seule augmente la sensibilité de la réaction au léger détriment de la spécificité. Elle n'en permet pas moins d'affirmer l'absence de malaria quand elle est négative, tandis que la réaction positive n'autorise pas, d'une façon catégorique, à porter le diagnostic de paludisme.

CHAPITRE II

LA RÉACTION A LA RÉSORCINE DE VERNES

Tous les phénols possèdent la propriété de précipiter le sérum. Testoni [90], en 1926, a montré que le sérum de cheval précipite avec tous les phénols : phénol ordinaire, pyrocatechine, résorcine, hydroquinone, pyrogallol. En 1910, Pandy [79] utilisa le phénol pour le diagnostic de la méningite tuberculeuse. L'acide phénique à 6,25 p. 100 additionné du liquide céphalo-rachidien normal, à la dose de 1 goutte ne le trouble pas; mais il provoque un précipité plus ou moins apparent dans le liquide pathologique. L'auteur attribue cette réaction à l'augmentation des globulines dans le liquide céphalo-rachidien des méningites. En 1926, Vernes, Bricq et Gager [102] ont étudié avec beaucoup de précision la floculation des sérums avec les divers phénols. Ils ont établi que les sérums tuberculeux présentent une sensibilité particulière et flocculent en présence de ces corps chimiques avec plus d'intensité et à des dilutions plus faibles que les sérums normaux. Pour des raisons techniques, ils ont adopté la résorcine, produit stable et bien déterminé, pour obtenir une réaction de caractère plus ou moins spécifique dans la tuberculose. La valeur et les défauts de cette réaction sont maintenant bien connus. Ninni et de Blasi [78], en 1930, ont préconisé l'utilisation de phénol ordinaire pour le diagnostic de la syphilis et de la tuberculose.

RÔLE DES PROTÉINES SÉRIQUES DANS LA RÉACTION.

En collaboration avec Prudhomme [32] nous avons étudié le mécanisme de cette réaction.

Le problème se trouve plus simplifié que dans la réaction de

Henry, car il s'agit non plus d'un prétendu antigène, mais d'un corps chimique parfaitement déterminé.

Pour élucider le rôle joué dans cette réaction par les diverses fractions protéiques, nous avons appliqué la méthode qui nous a servi pour la réaction de Henry. Les protéines sériques, extraites comme nous l'avons précisé plus haut, ont été ajoutées à des sérums normaux négatifs à la résorcine.

Les pseudoglobulines ne jouent qu'un faible rôle dans la réaction.

EXPÉRIENCE. — Un sérum humain est réparti en quatre tubes. Le premier sert de témoin, au deuxième on ajoute des pseudoglobulines à raison de 5 grammes, au troisième de 10 grammes, au quatrième de 20 grammes par litre. Comme dans toutes nos expériences précédentes sur l'addition des protéines, nous avons abandonné le mélange pendant deux heures à l'étuve à 37° C. et nous l'avons ensuite centrifugé. La réaction à la résorcine nous a donné les résultats suivants :

Sérum normal	9
Sérum normal + 5 grammes de pseudoglobulines par litre . .	9
Sérum normal + 10 grammes de pseudoglobulines par litre. .	9
Sérum normal + 20 grammes de pseudoglobulines par litre. .	8

La réaction ne varie pas par addition de pseudoglobulines.

D'autres expériences nous ont donné des résultats identiques.

De même, l'addition de pseudoglobulines à un sérum tuberculeux très positif ne modifie que très légèrement la réaction. Voici une de nos expériences.

A un sérum positif on ajoute des doses croissantes de pseudoglobulines :

Sérum tuberculeux	41
Sérum tuberculeux + 10 grammes de pseudoglobulines par litre.	41
Sérum tuberculeux + 20 grammes de pseudoglobulines par litre.	36

Cependant le rôle des pseudoglobulines n'est pas tout à fait négligeable, comme nous le verrons plus loin.

ACTION DES SÉRINES.

On répartit un sérum humain négatif à la résorcine en quatre tubes. Le premier tube sert de témoin, au deuxième on

ajoute des sérines en quantité correspondant à 5 grammes, au troisième à 10 grammes, et au quatrième à 20 grammes par litre. Le mélange est abandonné à l'étuve à 37° C. pendant deux heures et ensuite centrifugé pour le rendre parfaitement clair. La réaction pratiquée à la résorcine nous a donné les chiffres suivants :

Sérum normal	13
Sérum normal + 5 grammes de sérines par litre	13
Sérum normal + 10 grammes de sérines par litre	12
Sérum normal + 20 grammes de sérines par litre	13

Cette expérience nous montre que l'addition des sérines n'exerce aucune action sur la floculation à la résorcine du sérum normal.

Voyons maintenant comment ces protéines se comportent avec un sérum tuberculeux. Les expériences, faites comme précédemment, avec un sérum tuberculeux dont la réaction au photomètre de V. Y. B. est égale à 72, nous ont donné les résultats suivants :

Sérum tuberculeux	72
Sérum tuberculeux + 10 grammes de sérines par litre	41
Sérum tuberculeux + 20 grammes de sérines par litre	21

Il ressort clairement que l'augmentation des sérines dans un sérum tuberculeux le stabilise vis-à-vis de la résorcine et peut entraver complètement la réaction. Inversement on peut admettre que la diminution des sérines suffit à rendre positif un sérum négatif.

ACTION DES EUGLOBULINES.

Par addition de quantités croissantes d'euglobulines à un sérum normal, la réaction augmente en proportion des euglobulines ajoutées, comme le montre l'expérience ci-dessous choisie parmi plusieurs autres :

Un sérum normal est divisé en quatre parties. La première sert de témoin ; à la deuxième on ajoute des euglobulines à raison de 5 grammes, à la troi-

sième de 10 grammes, à la quatrième de 15 grammes par litre. La floculation à la résorcine est représentée par les chiffres suivants :

Sérum normal	12
Sérum normal + 5 grammes d'euglobulines par litre	48
Sérum normal + 10 grammes d'euglobulines par litre	84
Sérum normal + 15 grammes d'euglobulines par litre	123

Avec les sérum tuberculeux, la réaction croît aussi au prorata des euglobulines ajoutées. Par conséquent, parmi les protéines sériques, ce sont les euglobulines seules qui intensifient la floculation du sérum au contact de la résorcine.

Pour ces expériences l'utilisation des euglobulines non deséchées est de beaucoup préférable, car, avec la poudre d'euglobulines, les résultats, bien que de même ordre, sont toujours moins démonstratifs.

CE N'EST PAS L'INSOLUBILITÉ DES EUGLOBULINES DANS L'EAU DISTILLÉE QUI EST EN QUESTION. — Si les euglobulines agissent dans la réaction de Henry par leur insolubilité dans l'eau distillée, il ne peut être question d'un pareil mécanisme pour la réaction à la résorcine. On peut trouver des sérums pathologiques très instables dans l'eau distillée et négatifs à la résorcine ou inversement, comme on peut le voir d'après les chiffres ci-dessous que nous avons relevés chez un certain nombre de malades.

	FLOCCULATION dans l'eau distillée	RÉACTION à la résorcine
Sérum n° 1	5	29
Sérum n° 2	13	135
Sérum n° 3	69	66
Sérum n° 4	9	50
Sérum n° 5	1	100
Sérum n° 6	138	84
Sérum n° 7	221	10
Sérum n° 8	120	86

La réaction est évidemment due à l'action coagulante des phénols sur les protéines.

LE RÔLE ACTIF APPARTIENT-IL A UNE FRACTION DES EUGLOBULINES ?
— Les euglobulines que nous avons utilisées dans les expériences citées ci-dessus ont été préparées par le sulfate d'ammonium et la dialyse.

Nous avons essayé de partager les globulines en fractions plus nombreuses pour savoir si le principe actif se trouve localisé dans une d'entre elles et s'il est la propriété exclusive des euglobulines.

Étant donné la quantité considérable de sérum qu'il faut utiliser pour ces expériences, nous nous sommes adressé au sérum de cheval que nous pouvons avoir à discrétion. Nous avons dialysé le sérum entier dans un sac de collodion; au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures un précipité se forme au fond du sac qu'on sépare par centrifugation. Le liquide surnageant clair, dilué au 1/10 dans l'eau distillée, est saturé de gaz carbonique. On obtient ainsi un deuxième précipité préparé à nouveau par centrifugation.

Le reste des globulines est précipité à neutralité par le sulfate d'ammonium à demi-saturation et dialysé, desséché et réduit en poudre. On utilise les deux premières fractions à l'état frais.

La réaction à la résorcine, pratiquée avec ces sérums, a donné les résultats suivants :

Sérum normal.	5
Sérum normal + précipité obtenu par CO_2	7
Sérum normal + précipité obtenu par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	6
Sérum normal + précipité obtenu par dialyse.	436

Toutes les substances actives se trouvent donc contenues dans le produit de la dialyse. On ne reconnaît aucune action au reste des globulines dont une partie tout au moins est encore insoluble dans l'eau distillée.

Nous avons essayé de pousser plus loin le fractionnement en soumettant les euglobulines de dialyse à l'action de solutions de NaCl de concentration croissante.

Nous avons traité le précipité dû à la dialyse du sérum total par une solution de NaCl à 2 p. 1.000. Après un contact d'une heure à l'étuve à 37° et centrifugation, le résidu est repris par une solution de NaCl à 4 p. 1.000 dans les mêmes conditions que précédemment et la partie insoluble est séparée par centrifugation. Nous diluons les solutions d'euglobulines ainsi obtenues par NaCl à 2 et 4 p. 1.000 dans vingt fois le volume d'eau distillée pour précipiter les protéines solubles dans les solutions faibles de sels et on sépare celles-ci par centrifuga-

tion. Le liquide surnageant est pratiquement dépourvu de protéines et ne donne aucune des réactions classiques de l'albumine. Nous possédons donc trois fractions d'euglobulines de plus en plus insolubles. On incorpore ces trois précipités sans les dessécher dans trois échantillons d'un même sérum à raison de 10 grammes par litre environ. La réaction à la résorcine nous renseigne de la façon suivante sur le comportement de chacun :

Sérum normal	2
Sérum normal + euglobulines solubles dans NaCl à 2 p. 100.	2
Sérum normal + euglobulines solubles dans NaCl à 4 p. 100.	10
Sérum normal + euglobulines insolubles dans le NaCl, même à 4 p. 100.	360

On peut diluer ce sérum extrêmement positif à 1 p. 9 dans du sérum normal; la réaction pratiquée avec ce sérum, encore positive, est égale à 47. Donc, toutes les substances actives se trouvent contenues dans les euglobulines et dans les euglobulines les plus insolubles. Celles-ci possèdent une activité si grande que 1 gramme de protéines par litre de sérum le rend positif à la résorcine. Ces fractionnements apportent la preuve que la fraction euglobulinique est constituée par des protéines et probablement par des complexes lipoprotéiniques divers. On sait par les travaux de Achard et de ses élèves [1] que les globulines augmentent dans la tuberculose. Cette augmentation doit probablement porter en partie sur la fraction que nous avons isolée, mais en partie seulement, car la fraction spécifique possède une activité telle qu'elle rendrait la réaction à la résorcine illisible, si elle était seule en jeu dans cet accroissement important des globulines.

Quand la quantité des euglobulines augmente en proportion considérable, comme parfois dans le paludisme, il arrive, et Henry le premier l'a signalé, que la réaction à la résorcine devienne positive. Il résulte de ces constatations que les fractions euglobuliniques prédominantes dans le paludisme et dans la tuberculose sont ordinairement différentes.

A la consultation de M. le professeur Marchoux, pour les maladies tropicales, nous avons rencontré deux malades paludéens à *Pl. vivax* chez qui, à plusieurs reprises, la réaction de Henry faite avec ou sans indicateur donnait des résultats dou-

teux, tandis que la réaction à la résorcine était dans un cas égale à 79 et dans l'autre à 135. Les deux malades ne présentaient aucun signe de tuberculose. Il faut admettre qu'on puisse trouver dans le paludisme des réactions positives à la résorcine sans que la réaction de Henry suive la même évolution. Vernes et ses collaborateurs [102], à la suite de nombreuses observations, arrivent à la conclusion que la réaction résorcinique révèle surtout l'intervention d'un processus toxique surajouté. A la même conclusion arrive P. Bordet [41] qui a provoqué une réaction positive à la résorcine en inoculant à des lapins normaux la toxine du *B. coli*, ou à des animaux tuberculeux un peu de tuberculine.

La réaction à la résorcine serait donc très précieuse. Nous savons, en effet, que chez l'homme, naturellement résistant au bacille de Koch, la tuberculose évolue en raison de l'action exercée par les agents toxiques ou infectieux qui en altèrent la résistance. Elle permettrait ainsi de préjuger de l'entrée en sommeil ou au contraire de l'activité croissante de l'infection tuberculeuse. Aussi, Vernes attache-t-il une grande importance pronostique à une réaction résorcinique positive, de même que Achard à l'inversion du rapport sérine-globuline. Mais nous pensons que la résorcine pourrait aussi nous révéler l'instabilité organique d'un être exposé à la tuberculose, nous inviter à en rechercher la cause et jouer ainsi un rôle important dans la prophylaxie.

Aussi, nous nous attachons à suivre nos deux malades et à rechercher, chez eux, contre quelle intoxication ou infection il nous faut lutter pour leur éviter une atteinte encore problématique de tuberculose.

Il se dégage de ces observations les conclusions suivantes : 1° la fraction active dans la réaction à la résorcine préexiste dans le sérum normal, mais elle augmente au cours de certaines infections; 2° les fractions de globulines qui croissent varient avec chaque malade; 3° les réactions donnent donc des renseignements plus précis que les dosages, puisqu'elles portent sur les fractions spécifiques des globulines que le dosage ne peut mettre en évidence.

CHAPITRE III

KALA-AZAR (1).

C'est dans le kala-azar que le déséquilibre sérique qui nous intéresse atteint son maximum d'intensité. Les euglobulines se trouvent fortement augmentées d'après les dosages de Lloyd et Paul [64] qui, au lieu de 5 p. 100 de protéines totales ne trouvent en moyenne 30 p. 100 dans le sérum. Ce sérum présente en conséquence une instabilité très grande et on propose constamment de nouvelles réactions sérologiques, sans parler des réactions immunologiques d'agglutination ou de déviation du complément qui n'entrent pas dans le cadre de cet exposé.

On peut citer la formogélification de Gate et Papacostas, la formolopacification de Napier, la réaction à l'eau distillée de Brahmachari, la réaction de Auricchio et Chieffi, les réactions au divers composés d'antimoine comme l'uréastibamine, le néostibosane, ou d'arsenic, sulfarsénol et novarsénobenzol, etc. ; la réaction de Vernes à la résorcine a été toujours fortement positive dans les sérums de kala-azar que nous avons eus à notre disposition.

Nous aborderons maintenant à la lumière des résultats ci-dessus exposés l'étude du mécanisme de ces diverses réactions.

LA FORMOL-GÉLIFICATION proposée premièrement par Gate et Papacostas [44] pour le diagnostic de la syphilis en 1920, a été

(1) Nous ne discuterons ici que les travaux relatifs au mécanisme de la réaction, laissant de côté ceux qui n'ont qu'un intérêt clinique.

appliquée au sérum du kala-azar par Spackman [88] en 1924, ensuite par Napier [75] et par Fox et Mackie [42]. La technique en est très simple : on prépare trois tubes contenant chacun 1 cent. cube de sérum; au premier tube on ajoute I goutte de formol de commerce, au deuxième II gouttes, au troisième III gouttes. On agite le mélange et on le laisse reposer jusqu'à ce que la gélification se manifeste. Avec des sérums très positifs, la gélification se produit en quelques minutes. Si le sérum reste liquide après vingt-quatre à trente-six heures, la réaction est considérée comme négative. Rappelons de suite que la formol-gélification se produit dans de très nombreuses maladies en dehors du kala-azar : la tuberculose, la lèpre, la syphilis, la maladie du sommeil, le paludisme, le cancer, la cirrhose du foie, etc. Malgré cela, si elle reste encore dans la pratique courante, c'est que la technique en est très simple et peut être exécutée par la plupart des praticiens. Plus la formol-gélification est rapide, plus elle possède de valeur pour le diagnostic du kala-azar; mais elle est encore sujette à caution, car parfois elle se montre aussi promptement dans la lèpre, la tuberculose ou le cancer.

Spackman d'une part, Napier de l'autre, ne regardent comme positives que les réactions se produisant au plus tard en vingt minutes et s'accompagnant d'une opacification laiteuse plus ou moins apparente, surtout visible à la lumière réfléchie. Cette restriction donne une valeur diagnostique appréciable à la réaction. A la vérité, elle ne se produit pas avec tous les sérums de kala-azar, mais elle ne se rencontre qu'exceptionnellement sous cet aspect dans les autres maladies.

Pour plus de clarté nous allons étudier d'abord la gélification et ensuite la formol-opacification.

FORMOL-GÉLIFICATION. — Lloyd et Paul [64], d'après leurs expériences, arrivent à la conclusion que la formol-gélification est due aux euglobulines. Nous avons utilisé pour l'étude de cette question la technique que nous avons employée pour la réaction de Henry et la réaction à la résorcine; c'est-à-dire qu'avec le sérum en expérience nous avons procédé à l'addition des diverses fractions protéiques extraites du sérum normal. Les expériences ont été faites avec le sérum de cheval.

Quand à un sérum de cheval, contenant normalement 36 grammes de globulines et 42 grammes de sérines par litre, on ajoute des euglobulines, la réaction varie de la façon suivante :

GÉLIFICATION

Sérum normal.	Nulle au bout de 24 heures.
Sérum normal + 2 gr. 5 d'euglobulines fraîches par litre.	Au bout de 18 heures.
Sérum normal + 5 grammes d'euglobulines fraîches par litre.	Au bout de 15 heures.
Sérum normal + 10 grammes d'euglobulines par litre.	Au bout de 6 heures.
Sérum normal + 15 grammes d'euglobulines par litre.	Au bout de 2 heures.
Sérum normal + 20 grammes d'euglobulines par litre.	Au bout de 10 minutes.

On ne constate qu'une très légère opalescence avec des doses d'euglobulines de 15 et 20 grammes.

Donc, on peut déduire des résultats ci-dessus que la formol-gélification dépend de la quantité des euglobulines totales, mais ces protéines n'interviennent que pour une part, à la vérité la plus grande.

LES PSEUDOGLOBULINES INTENSIFIENT LÉGÈREMENT LA RÉACTION.

Si, avant d'ajouter les euglobulines, nous enrichissons le sérum en pseudoglobulines à raison de 20 grammes par litre, nous constatons que la réaction croît plus rapidement en intensité :

GÉLIFICATION

Sérum + 20 grammes de pseudoglobulines	Complète en 4 heures.
Sérum + 20 grammes de pseudoglobulines + 2 gr. 5 d'euglobulines	En 10 heures.
Sérum + 20 grammes de pseudoglobulines + 5 grammes d'euglobulines	En 2 heures.
Sérum + 20 grammes de pseudoglobulines + 10 grammes d'euglobulines	En 20 minutes.
Sérum + 20 grammes de pseudoglobulines + 15 grammes d'euglobulines	En 5 minutes.
Sérum + 20 grammes de pseudoglobulines + 20 grammes d'euglobulines	Presque instantanée.

Nous pouvons donc conclure que toutes les globulines

agissent dans la réaction, mais que les euglobulines manifestent une action beaucoup plus énergique que les pseudoglobulines.

LE RÔLE DES SÉRINES CONTRAIRE LA GÉLIFICATION.

Nous avons pris le même sérum et, avant de l'additionner d'euglobulines, nous l'avons enrichi en sérines à raison de 20 grammes par litre. Ce sérum, avec 10 grammes d'euglobulines, reste liquide après addition de III gouttes de formol pendant plus de vingt-quatre heures. Ce n'est qu'avec 20 grammes d'euglobulines qu'une gélification légère commence à se manifester vingt-quatre heures après addition de formol.

On peut conclure de ces expériences que la formol-gélification révèle une augmentation des globulines, pseudo-globulines et surtout euglobulines et une diminution des sérines. Ce sont justement les proportions trouvées dans la leishmaniose à l'aide du dosage par Lloyd et Paul et d'autres. Mais on peut rencontrer des modifications de l'équilibre sérique analogues dans des sérums recueillis chez des patients atteints d'autres maladies. Plus la quantité d'euglobulines sera grande, et plus la diminution des sérines prononcée, plus la formol-gélification sera rapide.

FORMOL-OPACIFICATION. — Lloyd et Paul admettent un double mécanisme pour la formol-opacification. Si l'on peut amener une formol-gélification par addition d'euglobulines à des sérums normaux, il faut, pour produire l'opacification, que les euglobulines proviennent de sérums de kala-azar. Ils concluent de cette observation qu'il existe des euglobulines particulières dans le kala-azar. Nos expériences confirment entièrement ces résultats. Mais nous ne partageons pas l'interprétation des auteurs précités.

Le pH du mélange joue un rôle important; Chopra et Choudhury n'ont vu l'opacification se produire qu'en milieu alcalin [21].

Nous avons procédé au fractionnement des euglobulines, comme précédemment pour la résorcine, en traitant par des solutions et à 2 et 4 p. 1.000 le précipité obtenu par dialyse

contre l'eau distillée. Les trois fractions ainsi obtenues sont ajoutées à trois échantillons d'un sérum normal en proportion de 20 grammes environ par litre. Le sérum, enrichi avec les euglobulines les plus insolubles, gélifie en moins d'une heure avec opacification nette. Les deux autres sérums se solidifient sans présenter la teinte blanchâtre si caractéristique des sérums de kala-azar.

Si cette fraction des euglobulines insolubles est spécifique du kala-azar, il n'en est pas moins vrai que pour la réussite de la réaction il faut aussi que l'ensemble des globulines augmente.

La conclusion qui se dégage de cette expérience, comme dans le sérum tuberculeux, est que les euglobulines ne sont pas des substances homogènes, qu'elles sont formées d'une mosaïque de fractions diverses et que les réactifs mettent en évidence telle ou telle d'entre elles.

Nous savons par ailleurs que la baisse des albumines est nécessaire pour que la formol-gélification produite par les euglobulines devienne possible. Il existe donc dans le kala-azar une diminution réelle des sérines en proportion très importante qu'on peut, d'après Lloyd et Paul, chiffrer à 20 à 30 grammes par litre.

Lloyd, Napier et Paul [65, 66], au cours de leurs recherches, ont vu que le traitement amène la décroissance très rapide de la quantité des euglobulines et que les pseudo-globulines au contraire augmentent. De telle sorte que l'inversion de formule sérines-globulines persiste malgré la diminution du chiffre des euglobulines.

Dans un cas de kala-azar que nous avons examiné en collaboration avec MM. R. Martin et G. Rouessé, on a trouvé, avant le traitement, 62 grammes de globulines totales et 25 grammes de sérines, en même temps qu'une réaction de formol-opacification très positive en trois à quatre minutes. Après huit mois de traitement, l'examen du sang relève 67 grammes de globulines et 25 grammes de sérines; mais la réaction de formol-opacification, lue au bout d'une heure, est devenue négative 71.

En conséquence la formol-gélification révèle dans le sérum la diminution des sérines et l'augmentation des euglobulines, la formol-opacification la prédominance d'une fraction des euglobulines insolubles dans une solution de NaCl à 4 p. 1.000.

SÉRUM DE KALA-AZAR ET FLOCCULATION DANS L'EAU DISTILLÉE.

Étant donné la quantité si considérable des euglobulines dans le sérum de kala-azar, on ne pouvait que s'attendre à le voir flocculer avec plus d'intensité que les autres dans l'eau distillée. Brahmachari [41 *bis*], en 1917, a remarqué qu'on obtient un trouble intense en ajoutant à de l'eau distillée quelques gouttes d'un tel sérum. Les résultats cliniques obtenus par cette méthode n'ont pas été concordants parce que la technique de la réaction n'était pas fixée. Milio [73] trouve cette épreuve très spécifique; Cerza [38], Castorina [46] lui attribuent une valeur de présomption. Navasso [76] ne lui reconnaît aucune valeur clinique. Caprara constate que la réaction se montre positive toujours dans la leishmaniose viscérale, mais rarement dans le paludisme, la syphilis et le typhus exanthématique [14].

Une technique plus rigoureuse permet d'utiliser cette propriété du sérum de kala-azar. Nous avons vu plus haut qu'il existe toute une échelle d'intensité dans la flocculation par l'eau distillée des sérums normaux, syphilitiques, paludéens et de kala-azar, et indiqué la nécessité de se servir d'un appareil optique tel que le photomètre de V. B. Y. Nous avons proposé pour cette réaction la technique que nous utilisons pour la réaction de Henry : l'examen des sérums frais, pris à jeun, dilués au 1/10 dans l'eau distillée. On observe alors : une flocculation très rapide et très intense; souvent la première lecture est impossible par suite d'une trop grande opacité. D'autres fois la flocculation est moins intense, la première lecture, faite le plus rapidement possible, dépasse 200 et le plus souvent 250° au photomètre. Cette première lecture suffit déjà à différencier les sérums du kala-azar de ceux du paludisme et *a fortiori* de ceux de la syphilis.

Quand les lectures restent possibles, nous procédons de la façon suivante : le mélange est abandonné à la température du laboratoire (18-20°) pendant deux heures, en agitant fréquemment le mélange pour éviter l'adhérence du précipité aux parois du tube et pour désagréger les flocculats trop gros et trop résistants qu'il deviendrait impossible à mettre en suspension homogène. En ce cas, il arriverait que la deuxième

lecture donnât un chiffre plus faible que la première, ce qui suffit à juger de l'erreur commise. Cependant, quand on opère correctement, on écarte cet inconvénient et la différence entre la première et la deuxième lecture dépasse 100.

Ce qui caractérise les sérums de kala-azar, ce sont la rapidité et l'intensité de la floculation.

Tous les auteurs reconnaissent que la réaction de Henry est très positive dans le kala-azar (Trensz chez le chien, Henry, Chorine, etc., chez l'homme) ce qui ne doit pas surprendre, puisque la réaction de Henry ne mesure que l'instabilité du sérum dans l'eau distillée.

Auricchio et Chieffi [6] ont modifié légèrement la technique de Henry, en ajoutant, au lieu de mélanine formolée, du peptonate de fer. La valeur clinique de cette réaction a été confirmée par Giraud, Ciaudo et Bernard [47] et par Verde [401]. Le peptonate n'agit ni par le fer, ni par la peptone. C'est un produit acide qui, additionné au mélange sérique dans les proportions préconisées par les auteurs italiens, baisse le pH de 2 ou 3 décimales. Par ce seul fait, il intensifie la floculation [35].

Des résultats analogues peuvent être obtenus avec un acide minéral tel que HCl. Si cette réaction ne fournit aucun renseignement que ne puisse donner l'eau distillée employée seule, elle confère, par la précision des mesures macroscopiques, une valeur clinique supérieure à la simple lecture à l'œil nu de la floculation dans l'eau distillée. Les mesures les plus rigoureuses sont faites sans doute à l'aide du photomètre de V. B. Y. sur le sérum frais.

ACTION DU PHÉNOL SUR LES SÉRUMS DE KALA-AZAR.

Nous avons vu, à propos de la tuberculose, que les phénols agissent sur une fraction des euglobulines parmi les plus insolubles dans l'eau distillée. L'augmentation si intense des euglobulines dans le kala-azar devait commander la précipitation facile par les phénols.

Nous avons examiné les sérums de kala-azar par la méthode de Vernes à la résorcine qui est un métadiphénol. Tous les sérums se sont montrés positifs à la résorcine. Les chiffres obtenus varient de 50 à 200.

Pour simplifier, nous avons utilisé l'acide phénique cristallisé. Le sérum à examiner est dilué dans l'eau physiologique à raison d'une partie de sérum pour 9 parties d'eau physiologique, et ensuite mélangé en parties égales avec des solutions de phénol de concentration différente. La lecture est faite au bout de dix minutes. Une opacification plus ou moins nette se produit, dont nous avons désigné l'intensité par des croix.

Phénol à 3 p. 100 neutralisé avec NaOH :

Sérum de kala-azar.	+++++
Sérum normal	++

Phénol à 4 p. 100 neutralisé avec NaOH :

Sérum de kala-azar.	+++++
Sérum normal	+

Phénol à 3 p. 100 neutralisé avec NaOH :

Sérum de kala-azar.	++++
Sérum normal	+ -

Phénol à 2 p. 100 neutralisé avec NaOH :

Sérum de kala-azar.	++
Sérum normal	0

Le phénol a été amené au pH 7.3 pour éviter la légère acidité de la fonction phénolique.

Cette action du phénol n'est pas due à une baisse de concentration moléculaire du milieu, car avec des solutions neutres de phénol dans l'eau physiologique à 9 p. 1.000 les résultats sont les mêmes. L'addition de chlorure de sodium renforce l'action du phénol plutôt qu'il ne la diminue. Le phénol possède donc une action propre sur les sérums de kala-azar.

La dilution du sérum permet une différenciation plus nette entre les divers sérums pathologiques, car un sérum se trouble d'autant plus facilement qu'il est plus riche en fractions euglobuliniques précipitables par le phénol.

Nous avons vu que l'école de Vernes utilise la sensibilité au phénol du sérum tuberculeux. Dans l'échelle d'intensité de flocculation des sérums avec le phénol se trouvent d'abord les normaux, ensuite les sérums syphilitiques, puis certains sérums lépreux, tuberculeux, celui des anciens paludéens, des trypanosomés, et finalement des malades atteints de leishmaniose viscérale.

Les autres phénols simples comme la phloroglucine produisent le même effet à une concentration de 2 à 3 p. 100. Par conséquent la fonction phénolique possède une action précipitante sur une partie des euglobulines contenue dans tous les sérums, et d'autant plus que la quantité en est plus forte.

ACTION DU TANNIN. — Certains autres corps plus complexes possédant des fonctions phénoliques comme le tannin, exercent une action beaucoup plus énergique que les phénols simples. On sait que ce corps très acide précipite tous les sérums à concentration suffisante. Nous utilisons une solution de tannin à 2,5 p. 1.000, neutralisée extemporanément par $\text{Na OH } \frac{\text{N}}{10}$ à $\text{pH} = 7,2$. A 1 cent. cube de cette solution, on ajoute une goutte de sérum à examiner. Dans ces conditions les sérums de kala-azar flocculent presque instantanément avec beaucoup d'intensité. Les sérums paludéens et tuberculeux flocculent plus faiblement et les sérums normaux restent à peine troubles. Cette réaction présente beaucoup de ressemblance avec la réaction à l'uréastibanine de Chopra [18-20].

ROLE DE LA FONCTION ALCOOL. — En additionnant à 1 cent. cube de sérum dilué au 1/10 dans l'eau physiologique, 1 cent. cube d'alcool éthylique à 30°, on provoque un trouble très marqué des sérums de kala-azar. Les sérums normaux restent clairs. Les sérums plus riches en euglobulines flocculent avec une intensité intermédiaire entre les deux.

L'alcool méthylique donne des résultats identiques à des concentrations différentes.

DISCUSSION DES RÉSULTATS.

On voit donc que certains corps chimiques à fonctions phénol ou alcool précipitent tous les sérums à des concentrations élevées; lorsqu'on les utilise à doses plus faibles, ils ne troublent plus que les sérums riches en euglobulines, notamment ceux de kala-azar.

Parmi toute la série de corps proposés pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale, certains doivent agir uniquement par

la fonction phénolique qu'ils possèdent, comme le sulfarsénol dans la réaction de Caminopetros [13, 46], le novarsénobenzol ou même l'uréastibamine dans la réaction de Chopra.

Il n'est donc pas étonnant que le nombre des réactions sérologiques croisse constamment pour le kala-azar, car on peut en trouver autant qu'il existe de phénols, soit simples, soit de structure plus complexe où la fonction phénolique se trouve sous une forme active. L'action des produits antimoniaux n'est sûrement pas due à la présence de l'antimoine tri- ou penta-valent, comme certains auteurs le supposent, mais à l'existence d'une fonction phénol ou alcool. Tous les sels d'antimoine que nous avons examinés ne manifestent aucun pouvoir diagnostique.

Nous diviserons les réactions sérologiques du kala-azar en trois catégories : 1° la formol-opacification, 2° les réactions basées sur la floculation dans l'eau distillée, et 3° les réactions sérologiques où certaines fonctions chimiques phénol ou alcool produisent une précipitation du sérum. Au point de vue clinique, il est utile de s'adresser à une réaction de chaque série pour avoir une réponse plus probante. Car ces réactions, comme toutes celles qui relèvent des euglobulines, ne sont que des réactions de probabilité dont la valeur croît avec le nombre des résultats positifs et des procédés employés pour les obtenir.

Comme illustration de ce que nous venons de dire, il convient de signaler l'observation de Giraud, P. Berthier, Ciaudo et Praliaud [48] qui relèvent, dans un cas d'endocardite maligne, des réactions très positives à l'uréastibamine, au peptonate de fer, et par la formol-gélification.

La présence dûment constatée des parasites spécifiques permet seule de porter un diagnostic certain.

RELATION ENTRE LES DOSAGES ET LES RÉACTIONS SÉROLOGIQUES.

Le dosage des protéines totales du sérum a quelques indications cliniques, surtout pour la néphrose lipoidique où les protéines se trouvent nettement diminuées. Mais dans d'autres maladies qui peuvent présenter une augmentation des protéines totales, comme la tuberculose, ce dosage devient de très faible secours.

Au fur et à mesure que nous entrons dans le détail, les résultats deviennent meilleurs. Déjà, le dosage des globulines totales peut être plus utilement employé pour guider le diagnostic dans la cirrhose du foie ou le kala-azar. Mais il convient d'ajouter que la fraction globulinique se trouve augmentée dans la plupart des maladies infectieuses.

Si l'on mesure la quantité des euglobulines, on fait un nouveau progrès. Malheureusement, nous sommes arrêtés par le manque de précision dans la définition des euglobulines. Qu'on désigne sous ce nom les protéines insolubles dans l'eau distillée, la quantité n'en peut être mesurée sans erreur parce qu'elle varie avec le pH, la dilution, la proportion des albumines, etc.

Il en est de même de celles qui sont obtenues par précipitation saline, sulfate de soude (Howe) ou sulfate d'ammonium (Porges). Il est facile de se rendre compte qu'après une précipitation par le sulfate de soude à 14 p. 100, le sérum contient encore des substances insolubles dans l'eau distillée. Cependant, malgré leur imperfection, ces méthodes ont permis à Lloyd et Paul d'affirmer avec justesse que presque 50 p. 100 des protéines totales dans un sérum de kala-azar sont constituées par les euglobulines.

Trensz a vérifié après ces deux auteurs que le sérum paludéen est plus riche en euglobulines que le sérum normal. Mais les dosages qu'il a faits avec M^{lle} Jardon lui ont montré que si la quantité des euglobulines augmente au cours du paludisme, il existe des sérums normaux, négatifs à la mélanine, encore plus riches en euglobulines que les sérums positifs.

Il faut en arriver à rechercher dans les euglobulines cette fraction dont nous avons fait ressortir la spécificité pour chaque maladie.

Conclusions.

1° La réaction de Henry n'est pas due à la présence d'anticorps dans le sérum des paludéens parce que :

a) La mélanine ne possède de propriété antigène que pour les organismes normalement dépourvus de ce pigment ;

b) La mélanofloculation commence à se manifester chez les

paralytiques généraux trois à sept jours après l'impaludation. Les anticorps demanderaient beaucoup plus de temps à se former ;

c) L'intensité de la réaction varie d'un jour à l'autre pour un même sérum conservé à la glacière. Ces variations seraient inexplicables si c'étaient des anticorps qui intervenaient dans la réaction ;

d) La réaction ne se produit que dans l'eau distillée ou les solutions hypotoniques. Les anticorps agissent dans les solutions isotoniques et même légèrement hypertoniques.

2° La floculation du sérum dans l'eau distillée suit fidèlement la mélanofloculation ;

3° La réaction de Henry se résume à la floculation du sérum dans l'eau distillée ou les solutions hypotoniques, la mélanine n'intervenant que pour en intensifier la perception ;

4° L'action de la mélanine devient celle d'un indicateur qui rend visible un phénomène inapparent. En tant qu'indicateur, elle peut être remplacée par plusieurs autres substances telles que carmin, corps microbiens, etc. ;

5° On peut provoquer la floculation de certaines fractions protéiniques du sérum en employant, au lieu d'eau distillée, divers agents chimiques ou physiques comme les acides et les phénols, et en intensifier la visibilité par addition de mélanine ou autres indicateurs. Cependant, aucune de ces réactions ne peut être identifiée avec la réaction de Henry.

6° Le mécanisme chimique de la réaction est très complexe. On peut grossièrement le résumer en quelques propositions :

a) La floculation est due à l'augmentation des euglobulines et des complexes lipoïdiques précipitables par l'eau distillée ;

b) L'élévation de la quantité des sérines paralyse la réaction ;

c) Les pseudoglobulines n'exercent qu'une faible action ; additionnées à un sérum positif, elles diminuent légèrement l'intensité de la réaction ;

d) Quand la concentration moléculaire du sérum en électrolytes augmente, l'intensité de la réaction baisse et inversement, parce que les euglobulines qui interviennent pour une grande part dans la réaction sont solubles en présence de sels minéraux. Les solutions non ionisées n'exercent aucune action sur la solubilité des euglobulines qui précipitent dans

une solution de sucre isotonique, comme dans l'eau distillée.

7° Le chauffage du sérum à 55° pendant une demi-heure abolit la réaction à la mélanine et rend le sérum plus stable vis-à-vis de l'eau distillée. Cette action est due à l'alcalinisation du sérum par départ de CO_2 dissous normalement dans le sérum à température plus basse.

8° Au point de vue clinique, il revient au même de mesurer la floculation du sérum au 1/10 dans l'eau distillée pure ou au 1/5 dans l'eau distillée additionnée d'indicateurs.

9° Il existe une concordance parfaite entre les données cliniques et l'évolution de la réaction. La réaction chez les paralytiques généraux devient positive du troisième au cinquième jour après l'injection du sang palustre. Elle croît en intensité jusqu'au sixième ou septième accès, où elle atteint son maximum.

10° Le traitement laisse la réaction stationnaire pendant une dizaine de jours et en amène la décroissance progressive ensuite. En cas de guérison, la réaction devient négative trente à soixante-dix jours après le commencement du traitement quinique. La quinacrine paraît agir plus vite.

11° La valeur clinique de la réaction est indéniable. Une réaction négative, en dehors de l'accès fébrile, indique l'absence de paludisme ; une réaction positive n'est qu'un signe de probabilité.

12° La réaction de la résorcine révèle un déséquilibre protéinique portant aussi sur les euglobulines :

a) Elle n'est pas influencée par l'addition à un sérum négatif de pseudoglobulines en proportion même très élevée ;

b) Les sérines inhibent la floculation d'un sérum tuberculeux ;

c) C'est une petite fraction seulement des euglobulines qui se montre active.

13° Dans le sérum de kala-azar particulièrement riche en euglobulines toutes les réactions sérologiques dues à ces protéines se montrent positives.

14° La formol-gélification dénonce l'augmentation des euglobulines, la diminution des sérines et, secondairement, l'élévation de la quantité des pseudoglobulines.

15° La formol-opacification de Napier est commandée par une toute petite fraction des euglobulines. Les euglobulines

totales extraites du sérum normal sont presque sans action.

16° Le sérum de kala-azar est instable dans l'eau distillée. Cette propriété, découverte par Brahmachari, a fourni dans la pratique les résultats les plus discordants en l'absence de technique précise. L'emploi du photomètre de Vernes apporte dans la mesure la précision qui manquait.

17° La réaction de Auricchio et Chieffi n'ajoute à l'eau distillée que le peptonate de fer qui, en abaissant le pH de 2 ou 3 décimales, provoque une plus abondante floculation.

18° Les alcools éthylique et méthylique précipitent les sérums de kala-azar à une concentration moindre que celle qu'il faut utiliser pour obtenir le même résultat avec les sérums normaux.

19° Les sérums de kala-azar sont plus sensibles à l'action du phénol que les sérums normaux.

20° La réaction de Caminopetros est due au groupement phénolique contenu dans le sulfarsénol ; il en est de même du novarsénobenzol.

21° Dans les réactions de Chopra ou de Nattan-Larrier[77], ce n'est nullement l'antimoine trivalent ou pentavalent contenu dans les corps employés qui réagit, mais très probablement des groupements chimiques simples tels que l'alcool ou le phénol.

22° Dans les diverses maladies où la réaction est fondée sur une augmentation de la quantité des euglobulines, il faut entendre que ce n'est qu'une partie des euglobulines normales qui seule s'accroît.

23° Les euglobulines du sérum ne représentent pas une substance homogène, on peut en séparer de nombreuses fractions partielles à fonctions différentes reposant pour chacune sur la présence de divers complexes lipoprotéiniques.

24° Au cours de diverses maladies, une de ces fractions commence à prédominer et détermine la réaction caractéristique de l'infection. Quand l'augmentation des euglobulines devient trop intense, plusieurs fractions entrent en jeu à la fois et renversent la barrière de la spécificité. Toutes les réactions commandées par les euglobulines jusqu'alors employées se montrent positives. Nous en avons un exemple dans le sérum de kala-azar.

25° Il est évident que les euglobulines totales qu'on extrait

du sérum tuberculeux ne sont pas identiques à celles qu'on retire du sérum paludéen ou du kala-azar ; les euglobulines pathologiques diffèrent des euglobulines du sérum normal. Les fractions caractéristiques à chaque maladie préexistent dans le sérum normal, mais en proportion différente de celle qu'on trouve dans les sérums pathologiques.

26° Les méthodes chimiques de dosage que nous possédons ne nous permettent pas jusqu'alors de préciser la proportion des diverses fractions actives contenues dans un sérum. Il ne faut donc pas nous étonner que nous ne puissions prévoir comment ce sérum va se comporter en présence de tel ou tel réactif.

Vu : *Le Président de Thèse,*

BINET.

Vu : *Le Doyen de la Faculté,*

G. ROUSSY.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLETY.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ACHARD (Ch.), BARIÉTY (M.) et CONOUNIS (A.). *Bull. Acad. de Méd.*, **52**, 1929, p. 153.
- [2] ADANT (M.). *C. R. Soc. de Biol.*, **111**, 1932, p. 241.
- [3] ADIDA (P.). *Gaz. des Hôp.*, **102**, 1929, p. 1137, et **103**, 1930, p. 475.
- [4] ALCAY (L.), CATTOIR (E.) et MARILL (F. G.). *Paris méd.*, 1933, p. 516.
- [5] ANDRIADZE. *Nach. der Trop. Med.*, Tiflis, **2**, 1929, p. 2.
- [6] AURICCHIO (L.) et CHIRFFI (A.). *Pediatrics*, **43**, 1935, p. 745.
- [7] BENHAMOU et GILLE. *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 1573.
- [8] BIASIOTTI (M.). *Il Policlinico*, 1933.
- [9] BONALBERTI (E.). *Boll. Ist. Sieroter. Mil.*, Milano, 1931.
- [10] BONNET (A.). *C. R. du II^e Congr. intern. du Paludisme*. Alger, **1**, 1930, p. 773.
- [11] BORDET (P.). *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 1256.
- [11 bis] BRAHMACHARI (U. N.). *Ind. Med. Gaz.* **52**, 1917, p. 319 et 429.
- [12] BROTZU (G.). *Soc. Intern. de Microbiol., Bull. d. Sez. Ital.*, **3**, 1911, p. 429.
- [13] CAMINOPETROS (J.). *C. R. Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 910.
- [14] CAPRARA. *Cultura Medica Moderna*, A. V., n° 30, 1926.
- [15] CARTANA CASIELLA (P.). *C. R. du II^e Congr. Intern. du Paludisme*. Alger, **1**, 1930, p. 789, et *Medico de Los Paises Calidos*, 1931.
- [16] CASTORINA. *Cité d'après Caprara*.
- [17] CHABRELIE (L.). *La séroflocculation du paludisme*. Thèse, Lyon 1928.
- [18] CHOPRA (R. N.). *Ind. Med. Gaz.*, **61**, 1926, p. 162, et *Ind. Journ. Med. Res.*, **15**, 1927, p. 41.
- [19] CHOPRA (R. N.), GUPTA (I. C.), BASU (N. K.) et DAVID (J. C.). *Ind. Med. Gaz.*, **62**, 1927, p. 325.
- [20] CHOPRA (R. N.), GUPTA (I. C.) et BASU (N. K.). *Ind. Med. Gaz.*, **62**, 1927, p. 434 et 688.
- [21] CHOPRA (R. N.) et CHOUDHURY (S. G.). *The Journ. of Med. Research.*, **16**, 1928-1929, p. 925.
- [22] CHORINE (V.). *Rivista di Mariologia*, **11**, n° 3, 1933.
- [23] CHORINE (V.). *C. R. Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 1164.
- [24] CHORINE (V.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **26**, 1933, p. 269.
- [25] CHORINE et GILLIER, *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 1419; *C. R. Acad. des Sc.*, 1933, p. 950; *Annales de l'Institut Pasteur*, **52**, 1932, p. 1419.
- [26] CHORINE (V.) et PRUDHOMME (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 290.
- [27] CHORINE (V.) et PRUDHOMME (R.) et KOECHLIN (D.). *C. R. Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 1255.
- [28] CHORINE (V.) et RODIEUX (M.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **26**, 1933, p. 1249.
- [29] CHORINE (V.) et KOECHLIN (D.). *C. R. Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 19.
- [30] CHORINE (V.) et KOECHLIN (D.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **28**, 1935, p. 375.
- [31] CHORINE (V.). *Rivista di Malarologia*, année 13, Sezione I, n° 6.
- [32] CHORINE (V.) et PRUDHOMME (R.). *Bull. Acad. de Méd.*, **111**, n° 10, 1934.
- [33] CHORINE (V.). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 1323.

- [34] CHORINE (V.). *Rev. colon. de Méd. et de Chir.*, n° du 15 octobre 1933.
- [35] CHORINE (V.) et PRUDHOMME (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **121**, 1936, p. 831.
- [36] CHORINE (V.). *C. R. Soc. de Biol.*, **21**, 1936, p. 297.
- [37] CHAWATT (L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 707.
- [38] CERZA (L.). *Pediatrics*, **38**, 1930, p. 394.
- [39] CORRADETTI (A.). *Riv. di Malariol.*, **2**, 1932, p. 283.
- [40] DHONT (C.). *Nederl. Tijdschr. v. Geneesk.*, **78**, p. 2188.
- [41] FARJOT. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **26**, 1933, p. 428.
- [42] FOX (E. C. R.) et MACKIE (F. P.). *Amer. Journ. of Hyg. Monograph.*, series n° 3, 1921, p. 229.
- [43] FIORENTINO (A.). *Pediatrics*, **38**, 1930, p. 137.
- [44] GATE (J.) et PAPACOSTAS. *C. R. Soc. de Biol.*, **83**, 1920, p. 1432; **85**, 1921, p. 1029.
- [45] GILLE (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 334.
- [46] GIRAUD (P.) et CIAUDO. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **28**, p. 379.
- [47] GIRAUD. CIAUDO et BERNARD. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **28**, 1935, p. 811.
- [48] GIRAUD (P.), BERTHIER, CIAUDO et PRALIAUD. *Bull. et Mém. Soc. med. de Paris*, **51**, 3^e série, 1935, p. 863.
- [49] GRIEG (E.), v. ROOYEN (C.) et HENDRY (E.). *The Lancet*, **1**, 1934, p. 1393, *Journ. of Trop. Med. and Hyg.*, **37**, 1934, p. 193 et 289; *Trans. Royal Soc. Trop. Med. a. Hyg.*, **28**, 1934, p. 175.
- [50] HENRY (A. F. X.). *Congr. de l'Assoc. franç. p. l'Avanc. des Sc.*, Constantine, **52**, 1927; *C. R. Soc. Biol.*, **99**, 1928, p. 819; **100**, 1929, p. 671; **101**, p. 259, 261 et 1026; **107**, 1931, p. 1520; **112**, 1933, p. 785. *Congr. de l'Assoc. franç. p. l'Avanc. des Sc.*, La Rochelle, **52**, 1928; *Paris médical*, 1930, p. 496; *C. R. du II^e Congrès intern. du Paludisme*, Alger, **1**, 1930, p. 750; *Arch. Inst. Prophyl.*, **1**, 1929, p. 341; *Bull. Soc. Path. Exot.*, **26**, 1934, p. 914.
- [51] HOFMEISTER (F.). *Arch. f. Exp. Path. Pharm.*, **24**, 1888, p. 247.
- [52] HOWE (P. F.). *Journ. Biol. Chem.*, **49**, 1921, p. 93 et 109.
- [53] KAPPUS (A.). *Archiv. f. Schiffs- und Tropen Hyg.*, **36**, 1932, p. 576.
- [54] KAROUT (T.) et MODALYSKAYA KRITCHEVSKAYA (V.). *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933.
- [55] KRITCHEVSKY (I. L.) et RUBINSTEIN (P. L.). *Zeit. f. Immunitätsf.*, **84**, 1935, p. 397.
- [56] LAVERGNE (J.) et MONIER (H.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **24**, 1931, p. 539.
- [57] LE BOURDELLÈS (B.). *Lyon médical*, 1928, p. 432; *C. R. Soc. Biol.*, 1928, p. 1349; *Soc. méd. des Hôp. de Paris*, **59**, 1933, p. 744.
- [58] LE BOURDELLÈS et FRIBOURG-BLANC (A.). *Soc. méd. des Hôp. de Paris*, **59**, 1935, p. 1013.
- [59] LE BOURDELLÈS (B.) et LIÉGEOIS (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **98**, 1928, p. 1342; **101**, 1929, p. 466 et 1148; *Soc. méd. des Hôp. de Paris*, **53**, 1924, p. 1198.
- [60] LE BOURDELLÈS (B.), LIÉGEOIS et CHABRELLIE (L.). *Arch. de Méd. et de Pharm. militaires*, **92**, 1930, p. 179.
- [61] LE BOURDELLÈS (B.) et VELLUZ (L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **108**, 1931, p. 402.
- [62] LIVIERATO, VAGLIANO et CONSTAKATO. *C. R. Soc. de Biol.*, **110**, 1932, p. 26.
- [63] LIVIERATO (S.) et SALATA (C.). *Acta med. Scandinavica*, **87**, 1933, p. 189.
- [64] LLYOD (R. B.) et PAUL (S. N.). *The Ind. Journ. of Med. Research.*, **16**, 1928-1929, p. 203.
- [65] LLOYD (R. B.) et PAUL (S. N.). *The Ind. Journ. of Med. Research.*, **16**, 1928-1929, p. 529.
- [66] LLOYD (R. B.), NAPIER (L. E.) et PAUL (S. N.). *The Ind. Journ. of Med. Research.*, **16**, 1928-1929, p. 1066.

- [67] LLOYD (R. B.) a. PAUL (S. N.). *Ind. Journ. Med. Res.*, **17**, 1929, p. 583.
- [68] MACHEBOEUF (M.). *Thèse de Doctorat ès-Sc.*, Paris, 1928. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **21**, 1929, p. 270.
- [69] MARCHOUX (E.) et CHORINE (V.). *Presse Médicale*, n° 101 du 18 décembre 1935.
- [70] MARCUS (E.). *Zeit f. Physiol. Chemie*, **28**, 1899, p. 559.
- [71] MARTIN (R.), CHORINE (V.) et ROUÉSÉ [G.]. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **28**, 1935, p. 382.
- [72] MEERSEMAN (F.) et LACOUR (P.). *C. R. Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 908.
- [73] MILIO. *Cité d'après Caprara*.
- [74] NANNI (C.). *Giorn. Med. milit.*, **80**, 1931, p. 381.
- [75] NAPIER (L. E.). *Ind. Med. Guz.*, **56**, 1921, p. 338; **58**, 1923, p. 104; **59**, 1924, p. 492. *Ind Journ. Med. Res.*, **9**, 1922, p. 830; **11**, 1924, p. 719.
- [76] NOVASSO (J.). *Pediatrics*, **31**, n° 5, 1923.
- [77] NATTAN-LARRIER et GRIMARD-RICHARD (L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 492.
- [78] NINNI et de BLASI. *Pathologica*, **30**, 1930, p. 233.
- [79] PANDY. *Neurol. Zentralblatt*, 1910, p. 915.
- [80] PINELLI (L.). *Riv. di Malariol.*, **8**, 1929, p. 310.
- [81] PORGES et SPIRO. *Beitr. z. Chem. Physiol. u. Path.*, **3**, 1903, p. 277.
- [82] POZZI (A.). *Il Policlinico sez. med.*, 1930, p. 361.
- [83] PRUDHOMME (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 1115.
- [84] PRUDHOMME (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **120**, 1935, p. 944.
- [85] RODILLON (G.). *Bull. Biol. Pharm.*, 1929, p. 207.
- [86] SABATUCCI (M.). *Riv. di Malariol.*, 1928, p. 853.
- [87] SOERENSEN (S. P.). *C. R. du Labor. Carlsberg*, **18**, n° 5, 1930.
- [88] SPACKMAN (W. C.). *Brit. Med. Journ.*, **2**, 1921, p. 266.
- [89] THEOBALT (M.). *Soc. Med. des Hôp. de Paris*, 1933, p. 752.
- [90] TESTONI (P.). *Archivio di Fisiologia*, **24**, 1926, p. 192.
- [91] TRENSZ (F.). *Bull. Soc. Path. exot.*, **25**, 1932, p. 230.
- [92] TRENSZ (F.). *Bull. Soc. Path. exot.*, **25**, 1932, p. 314 et *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, **15**, 1932, p. 445.
- [93] TRENSZ (F.) et JARDON (M.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **26**, 1933, p. 442.
- [94] TRENSZ (F.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **27**, 1934, p. 333.
- [95] TRENSZ (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, **55**, 1935, p. 208.
- [96] TRENSZ (F.). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 966.
- [97] TRENSZ (F.). *Arch. de l'Inst. Pasteur d'Algérie*, **13**, 1935, p. 513.
- [98] TRENSZ (F.). *Bull. Soc. Path. exot.*, **28**, 1935, p. 558.
- [99] TZEONOVITZER (M.), MODALYSKAYA-KRITCHEVSKAYA (V.) et GORCHOWA (E.) et FREIDMANN (G.). *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 1093.
- [100] TZEONOVITZER (M.), MODAVSKAYA-KRITCHEVSKAYA (V) et GORCHOWA (E.). *Zentralblatt. f. Bact.*, **36**, orig. 1932, p. 419.
- [101] VERDE (M.). *Pediatrics*, **43**, 1935, p. 894.
- [102] VERNES (A.), BRIQ et GAGER (A.). *Travaux et publications de l'Inst. prophyl.*, f. 4, 1926.
- [103] VIALATTE (Ch.) et REMOTET (E.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **23**, 1930, p. 590.
- [104] VLÈS et de COULON. *Arch. de Phys. biol.*, **5**, 1926, p. 161.
- [105] VOIGTLANDER (W.). *Zeitschr. f. Immunitätsf. u. Experim. Therap.*, 1934.
- [106] WISEMAN (H.). *The Lancet*, **2**, 1934, p. 543.

